

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Matthias Graw

**IMMUNHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN VON HSP70
AN GEHIRNEN VON SIDS-FÄLLEN**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Emina Sokocevic

aus
Sisak

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Randolph Penning

Mitberichterstatter: PD Dr. Peter Zill

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Andreas Büttner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2020

WIDMUNG

In Liebe und Dankbarkeit

meiner Tante Sada,

Mama & Papa

&

meinem Bruder Emir

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1. SIDS	1
1.2. Definition des SIDS und geschichtlicher Hintergrund.....	1
1.3. Epidemiologie und Risikofaktoren.....	3
1.4. Obduktionsbefunde bei SIDS-Säuglingen.....	4
1.5. Differentialdiagnose.....	4
1.6. ALTE (akute lebensbedrohliche Ereignisse).....	6
1.7. Ätiologie.....	6
1.8. Hitzeschockproteine (heat-shock-proteins, HSP).....	9
1.9. Fragestellung.....	11
 2. MATERIAL UND METHODEN.....	 12
2.1. Untersuchungsmaterial.....	12
2.2. Neuropathologische Untersuchungen.....	13
2.3. Antikörper.....	13
2.4. Immunhistochemische Untersuchungen.....	13
2.5. Rating.....	17
2.5.1. Graue Substanz.....	17
2.5.2. Weiße Substanz, subkortikale Areale, Hirnstamm	18
2.6. Statistische Auswertung.....	19
 3. ERGEBNISSE.....	 20
3.1. Zelldichte	20
3.2. Immunhistochemische Befunde.....	20
3.2.1. Telencephalon, Substantia grisea.....	21
3.2.1.1. Hippokampus.....	22
3.2.2. Telenzephalon, Substantia alba.....	24
3.2.3. Thalamus, Basalganglien und Capsula interna.....	26
3.2.4. Cerebellum.....	28
3.2.5. Mesencephalon.....	29
3.2.6. Pons und Ncl. olivaris.....	30

	Seite
4. DISKUSSION.....	31
4.1. Stichprobengröße.....	31
4.2. Material und Methoden.....	31
4.3. Hsp70.....	33
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	34
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	35
7. ANHANG.....	48
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	48
7.2. Neuropathologische Befunde: SIDS-Fälle.....	49
7.3. Neuropathologische Befunde: Kontrollfälle.....	50
7.4. Chemikalien.....	51
7.4.1. Antikörper.....	51
7.4.2. Sonstige Chemikalien.....	51
7.4.2.1. Protease (Proteinase K).....	51
7.4.2.2. Biotiniliertes Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin.....	51
7.4.2.3. Peroxidase-konjugiertes Streptavidin.....	51
7.4.2.4. Diaminobenzidin-Chromogen.....	51
7.4.2.5. PBS-Puffer.....	51
7.4.2.6. Gepuffertes Formalin.....	52
7.5. Ergebnisse (Tabellen).....	53
8. DANKSAGUNG.....	61

1. EINLEITUNG

1.1. SIDS (sudden infant death syndrome, plötzlicher Kindstod)

Ein plötzlicher unerwarteter Säuglingstod kann verschiedene natürliche und nicht-natürliche Ursachen haben, wobei neben krankhaften inneren Erkrankungen (angeborene Fehlbildungen, Stoffwechselstörungen, Tumoren) und traumatischen Einwirkungen der plötzliche Kindstod eine der häufigsten Todesursachen im Säuglingsalter ist. In den letzten Dekaden wurde jedoch durch das Erkennen und somit Vermeiden zahlreicher Risikofaktoren ein deutlicher Rückgang der Mortalität festgestellt. Daneben konnte durch die Erarbeitung definierter Diagnosekriterien eine erhöhte Zahl von Asphyxien oder genetischer Herzerkrankungen aufgedeckt werden, die zuvor fälschlicherweise als SIDS bezeichnet wurden (*Byard & Krous, 2003*). Trotz insgesamt sinkender Fallzahlen bleibt SIDS jedoch die führende Todesursache von Säuglingen in den Industriestaaten (*Paine et al., 2014*).

1.2. Definition des SIDS und geschichtlicher Hintergrund

Die Literatur der letzten Dekaden zeigte unterschiedliche Definitionen und Kriterien in der Diagnose SIDS, die eine Vergleichbarkeit der Studien und deren Bewertung erschweren (*Paine et al., 2014*). Diese bezogen sich z. B. auf die Untersuchungen zur Auffindesituation, der Einbeziehung einer klinischen Anamnese, die Altersangaben, das Durchführen zusätzlicher Tests sowie die Wertigkeit pathologischer Befunde (*Beckwith, 1993; Cordner & Willinger, 1995; Rambaud, 1994; Sturner, 1998*). Aufgrund mangelnder Übereinstimmung von Basiskriterien ergaben sich vielfach unterschiedliche rechtsmedizinische, pathologische polizeiliche und juristische Untersuchungen und Verfahren mit entsprechender Verunsicherung oder fälschlichen Anschuldigungen der betroffenen Familien (*Byard & Krous, 2003*).

Initial wurde SIDS mannigfaltig und nicht eindeutig bezeichnet, beispielsweise als plötzlicher Tod im Säuglingsalter, plötzlicher und unerwarteter Tod im Säuglingsalter, plötzlicher Kindstod oder Krippentod (*Valdés-Dapena, 1967*).

Bei der ersten Konferenz (1963) über die Ursachen des plötzlichen Todes bei Säuglingen wurde beschlossen, dass die vorangehenden Beschreibungen unzureichend sind; stattdessen

sollte der Begriff „plötzliches Todessyndrom“ verwendet werden (*Wedgewood & Benditt, 1965*).

Auf der zweiten Internationalen Konferenz (1969) wurden Richtlinien vorgeschlagen, wie SIDS als „plötzliches Säuglings-Todessyndrom“ definiert werden könnte (*Bergman et al., 1970*). Diese Richtlinien beinhalteten u. a. eine vollständige Obduktion einschließlich histologischer, mikrobiologischer und chemisch-toxikologischer Untersuchungen (*Bergman et al., 1970; Jones & Weston, 1976*).

Seit den frühen 1990er Jahren wurde SIDS dann definiert als „der plötzliche Tod eines Säuglings im Alter unter einem Jahr, welcher nach gründlicher Falluntersuchung einschließlich der Durchführung einer kompletten Obduktion, Untersuchung des Sterbeortes und eingehender Überprüfung der Anamnese, unerklärt bleibt“ (*Willinger et al., 1991*). Diese Definition wurde durch den Sachverständigenausschuss des National Institut of Child Health and Human Development (NICHD) durch zusätzliche Punkte erweitert die ein striktes Einhalten von Diagnosestandards forderten, insbesondere bei der Obduktion sowie der Untersuchung des Sterbeortes (*Centers for Disease Control: CDC, 1996*).

Die Zusammenarbeit zwischen SIDS International und NICHD resultierte in der Formulierung des „International standardized autopsy protocol for sudden unexpected infant death“ (ISAP), welches ebenfalls durch die Society for Pediatric Pathology und der National Association of Medical Examiners (NAME) übernommen wurde (*Krous, 1995; Krous & Byard, 2001*). Zeitgleiche wurde das „Sudden Unexplained Infant Death Investigation Reporting Form“ (SUIDIRF), ein formales Untersuchungsprotokoll des Sterbeortes, vom CDC erarbeitet (*Byard & Krous, 2001; CDC, 1996*). Obwohl die Protokolle nicht einheitlich angewandt wurden, führten zahlreiche Maßnahmen, wie zum Beispiel die gründliche äußere und innere Leichenschau, Radiologie, Histologie, Mikrobiologie, Toxikologie, metabolische und genetische Studien, zur signifikanten Erhöhung der Diagnosegenauigkeit (*Arnestad et al., 2002; Erck Lambert et al., 2016; Mitchell et al., 2000, 2017*).

Die neueste, sog. San Diego-Klassifikation definiert SIDS als „der plötzliche und unerwartete Tod eines Säuglings im ersten Lebensjahr, mit offensichtlichem Beginn der tödlichen Episode während des Schlafes, welcher nach einer gründlichen Untersuchung, einschließlich der Durchführung einer vollständigen Obduktion, der Überprüfung der Todesumstände und der Anamnese, ungeklärt bleibt.“ (Krous et al., 2004).

1.3. Epidemiologie und Risikofaktoren

SIDS ereignet sich vorwiegend innerhalb des ersten Lebensjahres, wobei der Altersgipfel im 2. bis 4. Lebensmonat liegt und Jungen zu 60% gegenüber 40% der Mädchen betroffen sind (Adams et al., 1998; Beal & Porter, 1991; Beal et al., 1994; Douglas et al., 1996). Die Mehrzahl der SIDS-Fälle werden im Herbst und Winter in beiden Welthemisphären (Douglas et al., 1996; Gupta et al., 1996) sowie im nächtlichen Schlaf beobachtet (Cornwell et al., 1998, Weissbluth, 1994;). SIDS-Fälle sind seltener in asiatischen (Lee et al., 1989) und häufiger in westeuropäischen, amerikanischen und afroamerikanischen Populationen (Adams, 1985; Alessandri et al., 1996; Irwin et al., 1992; Mitchell et al., 1993; Oeyen et al., 1990). SIDS tritt häufiger bei Säuglingen auf, deren Mütter jünger sind, einen niedrigen Ausbildungsstand und sozioökonomischem Status haben (Hauck, 2001; Peterson, 1982, 1988;). Weitere Risikofaktoren sind unzureichende pränatale Vorsorge und mütterlicher Drogenkonsum (Chavez et al., 1979; Daltveit et al., 1998; Hoffman et al., 1988; Hoffman & Hillman, 1992; Kandall et al., 1993; Kleemann et al., 1995; Mitchell et al., 1993; Rognum, 1995; Walker & McMillen, 1993).

Nach Anwendung der obengenannten Kriterien wurde die Rückenlage beim Säuglingsschlaf, mütterlicher Nikotinkonsum sowie das Schlafen im elterlichen Bett als Risikofaktoren entdeckt und Maßnahmen der SIDS-Prävention propagiert (American Academy of Pediatrics Task Force Positioning and SIDS, 1992; Blair et al., 1996; Dwyer et al., 1995; Gibson et al., 1995; Hauck, 2001; Markestad et al., 1995; Mitchell, 1995; Mitchell et al., 1992, 1994; Schoendorf & Kiely, 1992; Stanley & Byard, 1991; Task Force on Infant Positioning and SIDS, 1996; Willinger et al., 1994, 1998).

Weitere Auffälligkeiten die mit SIDS assoziiert sind und als mögliche Todesmechanismen diskutiert werden, umfassen u.a. pathologische Schlaf- und Atemmuster (*Kahn et al., 1992; Schechtman et al., 1996; Schulte et al., 1982*), Störungen beim Aufwachen (*Harper et al., 1981; Kahn et al., 1997; Schechtman et al., 1995*), Herzrhythmusstörungen (*Kahn et al., 1983; Sturmer et al., 1980*) sowie Hyperthermie (*Fleming et al., 1996; Gilbert et al., 1992; Kleemann et al., 1996; Krous et al., 2001; Moon et al., 2007; Nelson et al., 1989; Ponsonby et al., 1992, 1993; Wailoo et al., 1990; Williams et al., 1996*).

1.4. Obduktionsbefunde bei SIDS-Säuglingen

Bei SIDS-Fällen finden sich bei der Obduktion keine pathognomonischen Zeichen (*Berry, 1992; Krous, 1988; Rognum, 2001*). Der typische SIDS-Säugling hat einen altersgerechten Ernährungszustand ohne zugrundeliegenden Dysmorphien, Erkrankungen oder Verletzungen. Nachfolgende Befunde sind zwar häufig zu finden, aber weder diagnostisch noch obligatorisch und werden auch bei diversen natürlichen und nicht-natürlichen Säuglingstodesfällen beobachtet (*Byard & Cohle, 1994*):

- intrathorakale Petechien, möglicherweise als Resultat einer Obstruktion der oberen Atemwege oder agonaler Schnappatmung (*Beckwith, 1988; Byard & Krous, 1999; Krous & Jordan, 1984; Krous et al., 2001; Poets et al., 1999*), wobei die Atemwegsobstruktion durchaus ein agonales Phänomen und nicht das initiale Ereignis sein kann.
- oronasale Sekretionen sind typischerweise schaumig, mukoid, rosa und/oder blutig. Beim Fehlen einer kardiopulmonalen Reanimation, sollte jedoch an ein akzidentielles oder nicht-akzidentielles Erstickten gedacht werden (*Krous et al., 2001*).
- Pulmonale Stauung und Ödeme werden als terminales Versagen des linken Ventrikels gedeutet (*Becroft & Lockett, 1997; Byard et al., 1997; Milroy, 1999*).
- Hämosiderin in den Lungen kann auf frühere Traumata oder Asphyxie-Episoden hindeuten (*Becroft & Lockett, 1997; Byard et al., 1997; Milroy, 1999*).

1.5. Differentialdiagnose

Der Prozentsatz der falsch diagnostizierten SIDS-Fälle soll umgekehrt proportional dem Umfang der untersuchten Todesfälle der Säuglinge sein (*Meadow, 1999*). Zahlreiche

vaskuläre, kardiopulmonale, hämatologische, neurologische, gastrointestinale, urogenitale, endokrine, metabolische, infektiöse, hereditäre und idiopathische Erkrankungen und Funktionsstörungen können zu einem plötzlichen unerwarteten Säuglingstod führen. Ohne Durchführung einer vollständigen Obduktion einschließlich Zusatzuntersuchungen und Untersuchung der Todesumstände, können diese Todesfälle fälschlicherweise als SIDS bezeichnet werden (*Byard, 1996*).

Es ist schwer festzustellen, wie häufig Tötungsdelikte fälschlicherweise als SIDS bezeichnet werden (*Firstman & Talan, 2001*). Eine Regel besagt, dass der erste Todesfall innerhalb einer Familie als SIDS, der zweite als „nicht entschieden“ und der dritte als „Totschlag“ betrachtet werden soll. Wenn mehrere Todesfälle der Säuglinge innerhalb einer Familie auftreten, sollte eine Kindestötung ernsthaft in Betracht gezogen werden. Ein ungeklärter Todesfall sollte jedoch nicht automatisch als „Totschlag“ bezeichnet, wodurch z. B. ein SIDS oder eine andere Todesursache übersehen werden könnten (*Byard & Krous, 2003*).

Bei einer nicht vollständig durchgeführten Obduktion kann die Zahl der Kindestötungen als „typische SIDS-Fälle“ falsch diagnostiziert werden, seltene natürliche Funktionsstörungen oder vererbte Erkrankungen könnten übersehen oder mutmaßliche Behauptungen über schlechte elterliche Pflege nicht widerlegt werden.

Ein gewaltsames Ersticken kann manchmal allerdings selbst nach Durchführung einer Obduktion und der Untersuchung des Sterbeortes nicht mit der erforderlichen Sicherheit nachgewiesen werden. Eine Vergiftung mit seltenen Toxinen kann ebenfalls Schwierigkeit bereiten sofern nur ein toxikologisches Screening durchgeführt wird (*Byard et al., 2002*).

Ein winterlicher Höchststand von SIDS-Fällen assoziiert mit einer erhöhten Anzahl respiratorischer Erkrankungen lassen eine infektiöse Ätiologie durchaus naheliegend erscheinen (*Blackwell et al., 1995, 1997 und 2001; Byard & Krous, 2003*). Aufgrund eines noch unzureichend entwickelten Immunsystems und zeitgleicher Reduktion mütterlicher Antikörper sind Säuglinge besonders anfällig für Infektionen (*Bergman et al., 1970; Morris, 1999*). Es wurde bislang jedoch kein übereinstimmender Erreger gefunden (*Byard et al., 1992; Carmichael et al., 1996; Smith et al., 1992; Morris, 1999*) oder differierende Entzündungsparameter zwischen SIDS und Kontrollfällen nachgewiesen (*Kadhim et al., 2010; Vege et al., 1998*).

1.6. ALTE (akute lebensbedrohliche Ereignisse, Beinahe-SIDS)

ALTE sind Episoden, in denen ein Säugling apnoeisch, blass, zyanotisch, schlaff oder würgend, erstickend ist. Diese Episoden sind für den Beobachter erschreckend, aber der Säugling reagiert gut auf Reanimationsmaßnahmen und es kann keine sichtliche Ursache gefunden werden (*Byard, 1991*). ALTE wurde zuvor als „near miss-SIDS“ bezeichnet, heute wird empfohlen die Bezeichnung BREA (brief resolved unexplained events) zu verwenden (*Tieder et al., 2016*).

1.7. Ätiologie

Paine et al. (2014) veröffentlichten eine kritische Zusammenfassung bisheriger Forschungen auf diesem Gebiet, konnten jedoch von 153 veröffentlichten Studien nur 42 (27%) auswerten, welche definierte Kriterien (z.B. Alter, Geschlecht, Herkunft, postmortales Intervall, SIDS-Definition, Schlafposition, Anamnese) in beiden Gruppen (SIDS, Kontrollfälle) erfüllten. Das Problem der frühen Untersuchungen bestand zumeist in der uneinheitlichen Verwendung einer Definition von SIDS und dem Fehlen einer entsprechend gematchten Kontrollgruppe (*Paine et al., 2014*).

SIDS hat eine komplexe und heterogene Pathogenese mit infektiösen, umweltbedingten und genetischen Komponenten (*Byard & Krous, 2003; Kinney, 2009; Thach, 2005, 2008; Weese-Mayer et al., 2007*). Typischerweise wird ein offensichtlich gesundes Kind ohne vorherige Warnzeichen und üblicherweise nachdem es schlafen gelegt wurde tot aufgefunden (*Kinney & Thach, 2009; Krous et al., 2004*). Hierbei wurden multiple Risikofaktoren beschrieben, wie z.B. das Schlafen in Bauchlage, im elterlichen Bett, Frühreife und männliches Geschlecht (*Kinney & Thach, 2009*).

Die derzeit gängige Hypothese für das Auftreten von SIDS ist das „triple risk model“ (*Filiano & Kinney, 1994; Guntheroth & Spiers, 2002; Kinney, 2009; Thach, 2008*), welches folgende 3 Faktoren umfasst: 1) eine zugrundeliegende Vulnerabilität des Kindes, 2) eine kritische Entwicklungsperiode während der postnatalen Entwicklung in der sich die homöostatische Kontrolle entwickelt und 3) die Einwirkung eines exogenen Stressors wie eine erstickungsbegünstigende Umgebung oder kardiorespiratorische Belastung.

*

Nach diesem Modell kann ein scheinbar gesundes Kind an SIDS versterben, wenn alle 3 Faktoren simultan zusammentreffen (*Filiano & Kinney, 1994; Garcia et al., 2013; Harper & Kinney, 2010; Kinney, 2009; Kinney & Thach, 2009*).

Zahlreiche neuropathologische Studien bei SIDS-Todesfällen haben die Auffassung gestützt, dass diese Kinder vor dem Tod Abweichungen von Normalbefunden aufwiesen, die als eine vorbestehende Vulnerabilität ein erhöhtes Risiko für einen plötzlichen Tod sein können (*Kinney, 2009; Kinney & Thach, 2009*). Hierbei wurde insbesondere der Hirnstamm als übergeordnetes kardiorespiratorisches Regulationszentrum untersucht. *Naeye (1976)* war einer der ersten der über eine Astroglie im Hirnstamm bei 14/28 SIDS-Fällen (50%) berichtete. Weitere Untersuchungen kamen zu ähnlichen Ergebnissen (*Biondo et al., 2004; Kinney et al. 1983; Obonai et al., 1996; Sparks et al., 1996; Storm et al., 1999; Yamanouchi et al., 1993*), wenngleich diese Astroglie von einigen Autoren als Folge einer vorausgegangenen hypoxischen Schädigung angesehen wurde (*Becker & Takashima, 1985*).

Eine verzögerte neuronale Reifung, insbesondere im kaudalen Hirnstamm, soll bei SIDS weiterhin zu einer unzureichenden Schutzreaktion auf Stressoren führt (*Filiano & Kinney, 1992; Guntheroth & Spiers, 2002; Kinney & Thach, 2009*). So wurde hier z. B. eine erhöhte Zahl der neuronalen dendritischen Fortsätze nachgewiesen (*Becker, 1990; Becker & Zhang, 1996; Quattrochi et al., 1985; Takashima et al., 1985, 1994*). Die damit einhergehende erhöhte Synapsendichte könnte das Resultat fehlerhafter Elimination dendritischer Fortsätze während der Entwicklung sein (*O'Kusky & Norman, 1994; Scheibel et al., 1973*).

Alz-50 ist ein Antikörper, der ein Protein erkennt, welches u. a. in apoptotischen Neuronen beim Down Syndrom (*Sparks & Hunsaker, 1992*) und bei M. Alzheimer (*Hyman et al., 1988*) exprimiert wird und zu einer Mikrogliaaktivierung führt. Eine erhöhte Anzahl Alz-50-immunoreaktiver Neuronen bei SIDS steht in Einklang mit anderen Studien über eine erhöhte Apoptose bei SIDS (*Waters et al., 1999*) und könnte nach Ansicht der Autoren eine neurodegenerative Veränderung ähnlich der obigen Erkrankungen repräsentieren (*Oehmichen et al.; 1998; Sparks et al., 1996; Sparks & Hunsaker, 1991, 1999; Sparks & Hunsaker III, 2002*).

Basierend auf diesen Untersuchungen wurde nachfolgend die mögliche Rolle der Neurotransmitter in den kardiorespiratorischen Hirnstammzentren untersucht. Dabei fanden sich Anhaltspunkte, dass zumindest ein Teil der SIDS-Fälle durch eine zugrundeliegende Dysfunktion der medullären homöostatischen Kontrolle verursacht sein könnte, die die Antwort auf lebensbedrohliche Ereignisse wie Hypoxie, Hyperkapnie und Asphyxie während des Schlafs beeinträchtigt (*Kinney, 2009; Kinney & Thach, 2009*). Diese Fehlregulation wird zurückgeführt auf Störungen des neuronalen Netzwerks in den Hirnstammzentren, insbesondere der Medulla oblongata, die Atmung, Chemosensitivität, autonome Funktionen (Blutdruck, Herzfrequenz, Thermoregulation) und Schlaf kontrollieren (*Franco et al., 1998; Garcia et al., 2013; Harper & Kinney, 2010; Kinney, 2009; Poets et al., 1999; Sawaguchi et al., 2003; Schechtman et al., 1996; Sridhar et al., 2003*). Die zugrundeliegende Vulnerabilität bei SIDS-Säuglingen soll demnach Störungen in neuronalen Netzwerken sein, die kritische homöostatische Einflüsse kontrollieren (*Bright et al., 2018*). In zahlreichen Studien konnten hierbei im Hirnstamm Auffälligkeiten in verschiedenen neurochemischen Systemen nachgewiesen werden (*Bright et al. 2018; Machaalani & Waters, 2014*). Diese umfassten Veränderungen der:

Katecholamine (*Chigr et al., 1989; Denoroy et al., 1987*),
 Substanz P (*Bergstrom et al., 1984; Biondo et al., 2004; Bright et al., 2018; Jordan et al., 1997, Takashima et al., 1994*),
 Neurotensin (*Chigr et al., 1992; Coquerel et al., 1992*),
 β -Endorphin (*Coquerel et al., 1992*),
 Acetylcholinerge Rezeptoren (*Kinney et al., 1995; Kopp et al., 1993; Kubo et al., 1999; Mallard et al., 1999; Nachmanoff et al., 1998; Panigrahy et al., 2000*),
 GABA-Rezeptorbindungsstellen (*Broadbelt et al., 2011*).
 Serotonin und dessen Rezeptoren (*Duncan et al., 2010*),
 Aminosäuren wie Glutamat (*Machaalani & Waters, 2003, 2008*), und
 Wachstumsfaktoren (*Tang et al., 2012*).

Diese neurochemischen Veränderungen könnten nach derzeitigem Kenntnisstand die primären Defekte bei SIDS darstellen, die für ein Versagen der protektiven Mechanismen verantwortlich sind die z.B. einer homöostatischen Imbalance im Schlaf entgegenwirken.

Wenngleich diese Neurotransmitter-Hypothese für SIDS neurochemische Auffälligkeiten in verschiedenen Systemen umfasst, ist jedoch nach wie vor unklar, wie sich diese gegenseitig beeinflussen oder welchen Einfluss die Dysfunktion eines Neurotransmitters auf die assoziierten Kerngebiete ausübt (*Bright et al. 2018; Machaalani & Waters 2014*).

Der exakte Todesmechanismus ist somit bislang nicht geklärt und trotz der obengenannten Auffälligkeiten ist SIDS derzeit letztlich eine Ausschlussdiagnose die erst nach Einhaltung der definierten Kriterien gestellt werden kann (*Byard & Krous, 2003, Paine et al., 2014*).

1.8. Hitzeschockproteine (heat-shock-proteins, HSP)

Hitzeschockproteine (heat-shock-proteins, Hsp) zählen zur Gruppe der Chaperone und spielen eine zentrale Rolle in der normalen Zellphysiologie (*Agashe & Hartl, 2000; Schlesinger, 1990*). Sie werden, entsprechend ihres Molekulargewichts, in Gruppen bzw. Familien unterteilt. Im Gehirn ist bei zellulärem Stress insbesondere das Hsp70 von Bedeutung, da es die Neuronen vor einer Glutamatoxizität schützt (*Chen et al., 1996*).

Nach Einwirkung von Hitze und anderer exogener und endogener Faktoren (z. B. Trauma, Entzündungen, Ischämie, Hypoxie, Infektionskrankheiten, Medikamente) auf Zellen werden in kürzester Zeit Hitzeschockproteine exprimiert, die Teil der zytoprotektiven zellulären Stressantwort sind (*Brown, 1990; Chen et al., 1996; Ferriero et al., 1990; Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Pavlik et al., 2003; Sharp & Sagar, 1994; Sharp et al., 1994; Vass et al., 1988*). Ihre Aufgabe umfasst unter anderem eine regelrechte Proteinfaltung neu synthetisierter Proteine, die Stabilisierung fehlerhaft gefalteter oder denaturierter Proteine und die Degradierung geschädigter Proteine (*Agashe & Hartl, 2000; Bukau et al., 2006; Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Pardue et al., 2007; Schlesinger, 1990*).

Im Gehirn wurde in Tiermodellen eine Hsp70-Expression nach Einwirkung einer Hyperthermie in nahezu sämtlichen Zellarten nachgewiesen (Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia, Endothelzellen), wobei die Antwort jeweils unterschiedlich rasch erfolgte (*Brown, 1990; Pavlik et al., 2003; Sharma et al., 2003*). Hsp70 wurde hierbei zunächst in Glia- und Endothelzellen lokalisiert, wohingegen Neurone verzögert Hsp 70

exprimierten, was möglicherweise auf eine erhöhte Stressanfälligkeit hindeutet (*Nishimura & Dwyer, 1996; Pardue et al., 2007*).

Basierend auf diesen Daten wurde vorgeschlagen, das Hsp 70-Protein als anatomischen und biochemischen Marker für Zellschädigungen unterschiedlicher Genese einzusetzen (*Chen et al., 1996; Gonzalez et al., 1989*).

Bei der Untersuchung von Nierengewebe bei 54 SIDS-Fällen im Vergleich zu 29 Brand- bzw. Hitzetodesfällen konnte bei SIDS keine Expression von Hsp70 nachgewiesen werden (*Doberentz et al., 2011*). Nach Ansicht der Autoren schließt die fehlende Expression von Hsp70 bei SIDS jedoch eine einflussnehmende Hyperthermie nicht aus.

Nogami et al. (1999) untersuchten die Hsp 70-Immunoreaktivität in Neuronen der Medulla oblongata (N. hypoglossus, dorsaler Motorkern des N. vagus, lateraler Ncl. cuneatus und Ncl. olivaris inferior) in 34 rechtsmedizinischen Fällen mit diversen Todesursachen.

Hierbei zeigten sich zwar regionale und Todesart-abhängige Unterschiede, jedoch kein Zusammenhang mit einer prämortalen Stressdauer.

Kitamura et al. (1994) untersuchten u.a. die Hsp 70-Immunoreaktivität im Hippokampus in 41 rechtsmedizinischen Fällen mit hypoxisch/ischämischen Hirnschädigungen. Hierbei zeigte sich Hsp 70 in den CA2, CA3 und CA4 Regionen in Fällen langzeitigen Überlebens nach schweren hypoxischen/ischämischen Schäden und in Fällen, in denen kurz vor dem Tode eine Alkoholaufnahme oder Toluol-Missbrauch stattfand. Nach Ansicht der Autoren kann ein Nachweis von Hsp 70 im Hippokampus einen antemortalen hypoxisch/ischämischen Schaden anzeigen und ggf. Hinweise auf dessen Genese geben.

1.9. Fragestellung

Nachdem bei SIDS die Hyperthermie einer der Risikofaktoren ist (*Byard et al., 2010, Fleming et al. 1996, Gilbert et al., 1992, Kleemann et al., 1996*), war die Frage, ob eine vermehrte Expression von Hsp70 im Gehirn als Hinweis auf eine antemortale Hyperthermie in SIDS-Fällen beobachtet werden kann. Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass es bei SIDS zu einer morphologisch nachweisbaren Expression von Hsp 70 kommt, erfolgte die Zusammenstellung einer altersentsprechenden Gruppe verstorbener SIDS- und Kontrollfälle und deren Untersuchung mit immunhistochemischen Methoden auf lichtmikroskopischer Ebene.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Untersuchungsmaterial

Gewebeproben aus dem Gehirn obduzierter SIDS- und Kontrollfällen wurden nach 14-tägiger Fixation in 4-%igem gepuffertem Formalin, Wässern unter fließendem Wasser, Dehydratation, Einbettung in Paraffin und anschließendem Schneiden in 5 µm dicke Schnitte untersucht.

Es wurden folgende Hirnregionen ausgewertet:

Lobus frontalis, Substantia grisea

Lobus orbitofrontalis, Substantia grisea

Lobus occipitalis, Substantia grisea

Lobus parietalis, Substantia grisea

Lobus temporalis, Substantia grisea

Hippokampus

Lobus frontalis, Substantia alba

Lobus orbitofrontalis, Substantia alba

Lobus occipitalis, Substantia alba

Lobus parietalis, Substantia alba

Lobus temporalis, Substantia alba

Nucleus caudatus

Putamen

Globus pallidus

Clastrum

Thalamus

Capsula interna

Capsula externa

Mesenzephalon

Pons

Medulla oblongata

Oliva

Pyramis

Cortex cerebelli, Stratum moleculare, Stratum granulosum

Substantia alba cerebelli

Nucleus dentatus

Die Gruppe der untersuchten SIDS-Fälle bestand aus 13 männlichen und 14 weiblichen Personen im Alter von 1-11 Monaten mit einem Mittelwert von 5 Monaten. Die Kontrollgruppe umfasste 5 männliche und 10 weibliche Individuen im Alter von der 31. Schwangerschaftswoche bis 6 Jahre mit einem 15 Monaten.

2.2 Neuropathologische Untersuchungen

Mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnittpräparate wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Serge Weis (damals Institut für Neuropathologie der Universität Magdeburg) und Herrn Prof. Dr. Andreas Büttner histopathologisch begutachtet. Die Befunde bei den SIDS Fällen standen im Einklang mit der gestellten (Ausschluss-)Diagnose.

2.3 Antikörper

Der angewandte Antikörper Hsp 70 wurde in einer 1:500 Verdünnung verwendet. Die detaillierten Daten sowie die Bezugsquellen befinden sich im Anhang (Kapitel 7.4.1.).

2.4. Immunhistochemische Untersuchungen

Das Ziel der Immunhistochemie ist die Identifizierung und Lokalisation zellulärer Antigene mittels spezifischer Antikörper, welche gegen diese Antigene gerichtet sind. Eine stattfindende Antigen-Antikörper-Reaktion wird durch die farbgebenden Enzymmarker sichtbar gemacht. Diese Methode wurde gewählt, da sie eine sehr sichere Identifizierung, der zu untersuchenden Zellen, beziehungsweise der Zell- und Gewebsbestandteile erlaubt. In dieser Arbeit wurde die Avidin-Biotin-Methode angewandt. Bei dieser Methode handelt es sich um ein indirektes immunhistochemisches Nachweisverfahren, bestehend aus nachfolgenden Schritten:

- Spezifisch gegen das zu untersuchende Antigen gerichteter primärer Antikörper.
- Biotin-konjugierter (biotinilierter) Brückenantikörper, welcher sich an den Erstantikörper bindet.

- Komplex aus Peroxidase-konjugiertem Streptavidin, der sich an das Biotin des Brückenantikörpers bindet und zugleich die Farbreaktion vermittelt.

Die immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper Hsp70 erfolgten nach initialer Vorbereitung der Gewebsschnitten (SIDS und Kontrollfälle).

Die detaillierten Angaben über verwendeten Substanzen und die Bezugsquellen finden sich im Anhang (7.4).

Die immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper Hsp70 wurde entsprechend den nachfolgend aufgelisteten Schritten an jeweils den SIDS- und Kontrollschnitten durchgeführt:

Vorbehandlung:

Entparaffinierung in Xylol über 30 Minuten

Rehydratation in der absteigenden Ethanolreihe:

100 % 5 Minuten

96 % 1 Minute

70 % 1 Minute

Spülen in Aqua destillata

Andauung zur Demaskierung der Antigenbindungsstellen, welche durch die Aldehydvernetzungen des Formalins blockiert sein können:

Auflösung von 0,02 g Protease in 200 ml PBS-Puffer (pH 7,5) und Einlegen der Schnitte für 15 Minuten.

1. Waschen in PBS- Puffer für 10 Minuten.
2. Gewebebehandlung mit 3% Wasserstoffperoxidlösung für 10 Minuten zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität.
3. Waschen in PBS- Puffer für 10 Minuten.
4. Beträpfeln der Schnitte mit Kaninchen- Normalserum, Verdünnung 1:10, um elektrisch geladene Gewebsbestandteile durch Proteinneutralisierung zu neutralisieren: Einlegen der Schnitte für 15 Minuten in die feuchte Kammer. Ansatz: 0,5 ml Normalserum + 5 ml PBS- Puffer.
5. Abkippen des Normalserums.

6. Inkubation mit dem primären Antikörper 1650µl Antibody Diluent Reagent Solution auf 2.2 µl Hsp70 für 60 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
7. Zweimaliges Waschen in PBS- Puffer, jeweils für 10 Minuten
8. Inkubation mit dem 1:400 in PBS- Puffer verdünnten biotinilierten Brückenantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
9. Waschen in PBS- Puffer für 10 Minuten.
10. Inkubation mit dem 1:1000 in PBS- Puffer verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Komplex für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.
11. Inkubation mit der Wasserstoffperoxid-aktivierten DAB-Chromogenlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur.
12. Waschen in Aqua destillata für 10 Minuten.
13. Gegenfärbung mit Mayer's Hämalun für 30 Sekunden
14. Bläuen unter fließendem Wasser für 10 Minuten.
15. Dehydratation in der aufsteigenden Ethanolreihe:
 - 70 % 1 Minute
 - 96 % 1 Minute
 - 100 % 2x 5 Minuten
16. Einlegen in Xylol für 10 Minuten
17. Einschließen der Gewebeschnitte in Eukitt

Farbergebnis: Durch die Oxidation des DAB entsteht ein unlösliches braunes Endprodukt, welches lichtmikroskopisch an den Stellen einer stattgefundenen Antigen-Antikörper Bindung sichtbar wird (*Boenisch 1989*) (Bild 1).

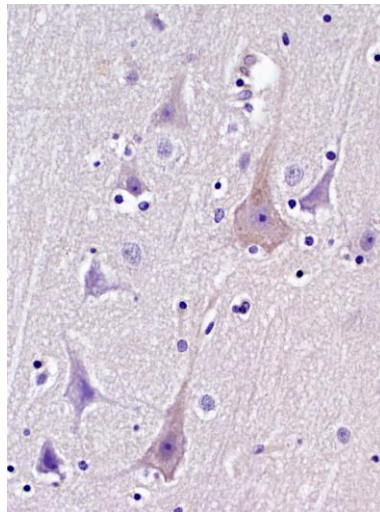


Bild 1: Immunhistochemische Darstellung von Hsp 70 im parietalen Kortex eines Kontrollfalles

(Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

2.5. Rating

Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter einem Leitz Biomed Mikroskop bei einer 400-fachen Vergrößerung. Je Gesichtsfeld wurde die Gesamtzahl der Hsp70-positiven Zellen:

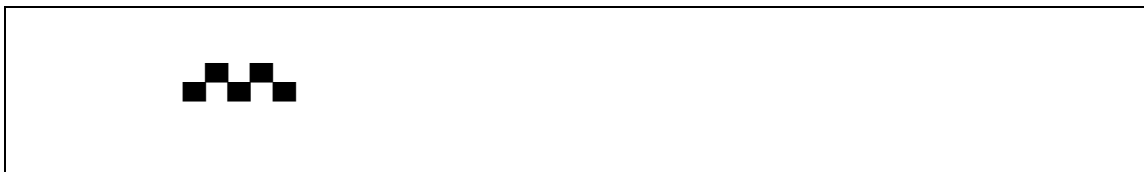
2.5.1. Graue Substanz:

Die graue Substanz der Großhirnrinde wurde nach dem „systematic row sampling“ ausgewertet (*Weis, 1991*). Für die Analyse wurde ein Gebiet mit geradem Verlauf der Rindenoberfläche ausgewählt. Sodann wurde das erste Messfeld an der pialen Oberfläche positioniert. Nun wurden alle immunpositiven Zellen in diesem Messfeld gezählt, einschließlich derer, die den linken bzw. oberen Rand des Rasters berühren, nicht jedoch diejenigen, die den rechten, bzw. unteren Rand berühren (Regel der verbotenen Linien). Danach wurde das Messfeld nach unten verschoben, so dass es genau anschließend an das erste Messfeld zu liegen kam. Auf diese Weise wurde bis zum Erreichen der weißen Substanz fortgefahren, wodurch eine vertikale Reihe entstand. Danach wurde das Messfeld wieder zur pialen Oberfläche geführt und seitlich anschließend an das erste Messfeld der ersten Reihe platziert um die nächste vertikale Reihe auszuzählen. Auf diese Weise wurden fünf vertikale Reihen ausgewertet.

+-----+	
+-----+-----	I. Molekularschicht
+-----+-----	II. Äußere Körnerschicht
+-----+-----	III. Äußere Pyramidenschicht
+-----+-----	IV. Innere Körnerschicht
+-----+-----	V. Innere Pyramidenschicht
+-----+-----	VI. Spindelzellschicht

2.5.2. Weiße Substanz, subkortikale Areale, Hirnstamm

In der weißen Substanz (Marklager) und in der subkortikalen grauen Substanz, im Kleinhirn und im Hirnstamm erfolgte die Auswertung nach den „random systematic sampling“ (*Weis, 1991*). Hierbei wird die Position des ersten Messfeldes rein zufällig gewählt. Die weiteren vier Felder wurden vom ersten Gesichtsfeld ausgehend mäanderförmig ausgewählt (siehe untenstehendes Schema). Insgesamt kamen jeweils 5 Gesichtsfelder pro Hirnregion zur Auswertung.



Mittels oben genannter Verfahren erfolgte die Datenerhebung für die Hirnregionen in SIDS- und Kontrollpersonen. In einem zweiten Arbeitsschritt erfolgte die Berechnung der Zelldichte anhand der Formel:

$$\text{Gefäßdichte} = \frac{\text{Anzahl der Hsp70-positiven Zellen}}{\text{Anzahl der Gesichtsfelder} \times \text{Messfeldfläche}}$$

Die Messfeldfläche betrug 0,248mm x 0,248mm.

2.6. Statistische Auswertung

Nach Erhebung der Daten am histologischen Schnitt wurden die Parameter in eine Datenmatrix eingegeben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des SPSS-Programms (statistical package for the social sciences). Neben dem Student's t-Test für unabhängige Stichproben kamen der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test sowie Varianzanalysen und die Berechnung von Korrelationskoeffizienten nach Pearson zur Anwendung. Dabei gelten p-Werte von unter 0,05 als statistisch signifikant. Die graphische Darstellung der Daten wurde mit dem Programm Microsoft Excel 2002 durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

Die Kontrollgruppe wies im Vergleich zu den SIDS-Fällen ein höheres Durchschnittsalter auf. Bezüglich der Variablen Körpergröße, Körpergewicht, Hirngewicht und postmortale Liegezeit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der SIDS- und der Kontrollgruppe (*Tabelle 3, Anhang*). Es fiel jedoch auf, dass die SIDS-Fälle im Vergleich zu den Kontrollen bezüglich ihres Geburtsgewichts und der Geburtskörperlänge kleiner waren, und dieser Trend bis zum Todeszeitpunkt bestand.

Ebenfalls wurden gegenüber der Kontrollgruppe niedrigere Hirngewichte verzeichnet. Die postmortale Liegezeit war bei den SIDS-Fällen jedoch etwas länger. Keine dieser Daten waren allerdings signifikant unterschiedlich.

3.1 Zelldichte

Die Zelldichte (Zellzahl/ μm^2) wurde an folgenden Gehirnregionen bestimmt: Lobi frontalis, fronto-orbitalis, occipitalis, parietalis, temporalis, Hippokampus (Area 1, 4 und Gyrus dentatus), Thalamus, Basalganglien (Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus), Capsula interna, Cerebellum mit Nucleus dentatus, Mesencephalon, Pons und Olive. Es fanden sich mit Ausnahme von fünf Hirnregionen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

3.2. Immunhistochemische Befunde

Die immunhistochemischen Färbungen und die Bestimmung der Zelldichte erfolgten an folgenden Regionen: Lobi frontalis, fronto-orbitalis, occipitalis, parietalis, temporalis, Hippokampus (Area 1, 4 und Gyrus dentatus), Thalamus, Basalganglien (Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus), Capsula interna, Cerebellum mit Nucleus dentatus, Mesencephalon, Pons und Olive.

3.2.1. Telencephalon, Substantia grisea

Im Folgenden werden die Daten der Hsp70-positiven Zellen und der totalen Zelldichte in den obigen Hirnregionen dargestellt (Abbildung 1). In diesen Regionen fanden sich keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis von Hsp70-positiven zu den Hsp70-negativen Zellen, bzw. zu der Gesamtzellzahl zwischen der Kontrollgruppe und den SIDS-Fällen. Die unterschiedlichen Trends in der Ab- bzw. Zunahme wurden wie folgt bestimmt:

Frontal stellte sich ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 51,70 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe gegenüber 8,31 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,26$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 377,57 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 313,02 Zellen/mm² ($p=0,45$) in der SIDS-Gruppe dar.

Fronto-orbital zeigte sich ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 42,68 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe gegenüber 32,29 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,31$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 583,84 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 336,37 Zellen/mm² ($p=0,65$) in der SIDS-Gruppe.

Parietal ergab sich ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 52,96 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe gegenüber 3,02 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,26$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 293,12 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 276,53 Zellen/mm² ($p=0,53$) in der SIDS-Gruppe.

Temporal stellte sich ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 56,87 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe gegenüber 3,58 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,29$), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 298,51 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 394,10 Zellen/mm² ($p=0,07$) in der SIDS-Gruppe dar.

Occipital zeigte sich ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 18,89 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe gegenüber 5,69 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,90$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 353,09 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 351,35 Zellen/mm² ($p=0,90$) in der SIDS-Gruppe.

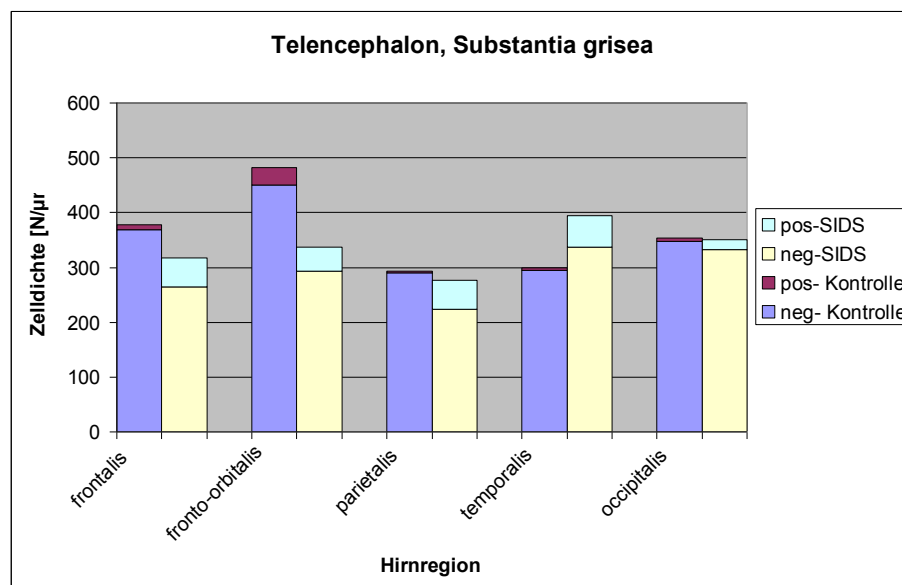


Abbildung 1: Telencephalon, Substantia grisea

3.2.1.1. Hippokampus

In der **CA1-Region** zeigte sich eine signifikante Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 199,99 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe gegenüber 31,34 Zellen/mm² ($p=0,01$) in der Kontrollgruppe (Abbildung 2, Bild 2).

Bei der Gesamtzellzahl wurde ein geringfügiger, nicht signifikanter Trend in der Zunahme auf 407,69 Zellen/mm² in der SIDS-Gruppe gegenüber 405,77 Zellen/mm² ($p=0,35$) in der Kontrollgruppe verzeichnet.

In der **CA4-Region** und im **Gyrus dentatus** wurden zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abbildung 2).

In der **CA4-Region** zeigte sich in der SIDS-Gruppe ein Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 142,67 Zellen/mm² gegenüber 63,85 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,23$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 383,41 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 316,84 Zellen/mm² ($p=0,29$) in der SIDS-Gruppe.

Im **Gyrus dentatus** stellte sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 865,04 Zellen/mm² gegenüber 559,90 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,44$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 2290,75

Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 2212,15 Zellen/mm² ($p=0,78$) in der SIDS-Gruppe dar.

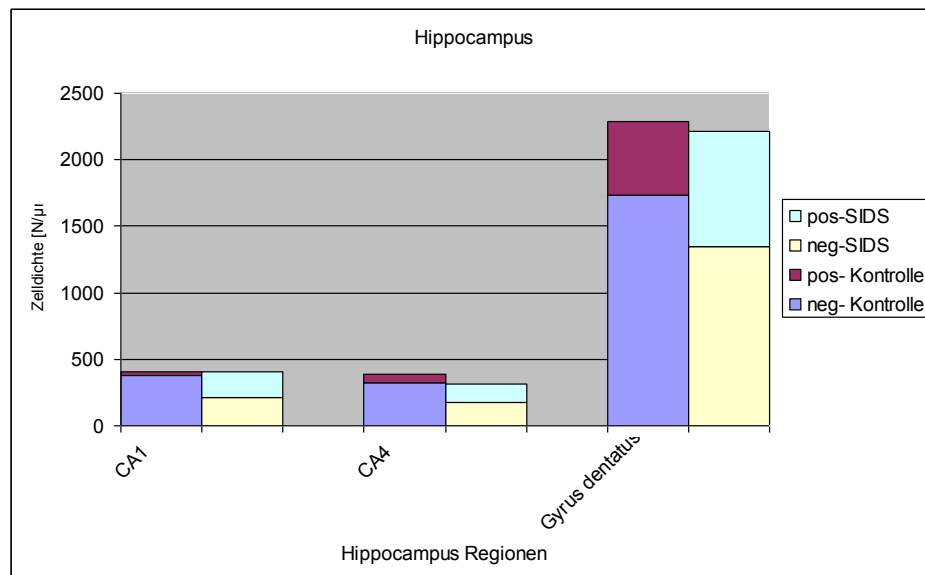


Abbildung 2: Hippokampus

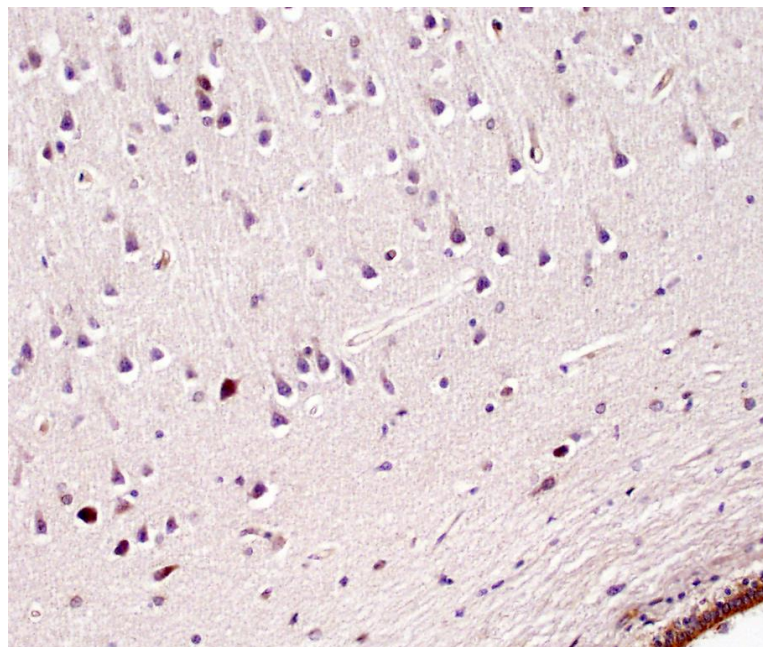


Bild 2: Immunhistochemische Darstellung von Hsp 70 in der CA1 Region des Hippokampus bei SIDS

(Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 200x)

In der gesamten grauen Substanz des Telencephalons stellte sich somit eine deutliche, wenngleich statistisch nicht signifikante Zunahme der Hsp70-positiven Zellen in der SIDS-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe dar, sowie ein nicht signifikanter Trend in der Abnahme der Gesamtzellzahl bei den SIDS-Fällen. Lediglich temporal war ein nicht signifikanter ubiquitärer Trend in der Zunahme bei allen Hsp70-gefärbten Zellen (positiv, negativ, Gesamtzellzahl) in der SIDS-Gruppe zu vermerken. Ebenfalls abweichend vom obigen Befund zeigt sich eine signifikante Zunahme isoliert in der Hippokampusregion-CA1 bei den Hsp70-positiven Zellen.

3.2.2. Telencephalon, Substantia alba

In der weißen Substanz fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der SIDS-Gruppe weder bei den Hsp70-positiven Zellen noch bei der Gesamtzellpopulation (Abbildung 3).

Die Trends in der Ab- bzw. Zunahme zwischen beiden Gruppen war folgendermaßen:

Frontal ergab sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 14,25 Zellen/mm² gegenüber 3,61 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,21$), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 68,81 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 90,10 Zellen/mm² ($p=0,14$) in der SIDS-Gruppe.

Fronto-orbital stellte sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Abnahme der Hsp70-positiven Zellen auf 12,49 Zellen/mm² gegenüber 13,70 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,98$), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 86,40 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 114,48 Zellen/mm² ($p=0,07$) in der SIDS-Gruppe dar.

Temporal ergab sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 12,24 Zellen/mm² gegenüber 3,90 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,55$), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 41,94 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 52,79 Zellen/mm² ($p=0,14$) in der SIDS-Gruppe.

Parietal zeigte sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 8,05 Zellen/mm² gegenüber 6,04 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe (p=0,26), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 66,64 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 62,55 Zellen/mm² (p=0,65) in der SIDS-Gruppe.

Occipital stellte sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 6,31 Zellen/mm² gegenüber 3,25 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe (p=0,65), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 49,18 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 65,57 Zellen/mm² (p=0,06) in der SIDS-Gruppe dar.

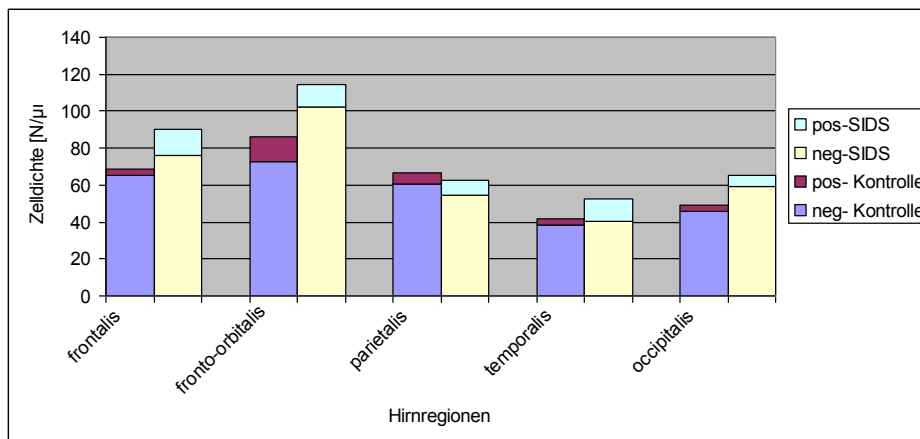


Abbildung 3: Telencephalon, Substantia alba

Insgesamt zeigen sich in der weißen Substanz des Telencephalons tendenziell mehr Hsp70-positive Zellen in der SIDS-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe, teilweise mit nur geringfügigem Unterschied.

Ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiver Zellen sowie der Gesamtzellzahl erstreckt sich ubiquitär in der weißen Substanz des Telencephalons, ausgenommen der Gesamtzellzahl in der Parietalregion und bei den Hsp70-positiven Zellen fronto-orbital. Hier zeigt sich jeweils ein nicht signifikanter Trend in der Abnahme der Zellen bei der SIDS-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

3.2.3. Thalamus, Basalganglien und Capsula interna

Im *Thalamus* fand sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 70,82 Zellen/mm² gegenüber 43,43 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,26$), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 99,28 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 116,66 Zellen/mm² ($p=0,40$) in der SIDS-Gruppe (Abbildung 4).

Im *Nucleus caudatus* zeigte sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 91,66 Zellen/mm² gegenüber 12,41 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,17$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 529,81 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 295,30 Zellen/mm² ($p=0,91$) in der SIDS-Gruppe (Abbildung 4).

Im *Putamen und Globus pallidus* sowie in der *Capsula interna* ergaben sich signifikante Unterschiede in beiden Gruppen (Abbildung 4, Bild 3).

Im *Putamen* zeigte sich in der SIDS-Gruppe eine signifikante Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 80,68 Zellen/mm² gegenüber 1,48 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,04$). Bei der Gesamtzellzahl ergab sich demgegenüber in der Kontrollgruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme von 241,52 Zellen/mm² gegenüber 298,55 Zellen/mm² ($p=0,34$) in der SIDS-Gruppe.

Im *Globus pallidus* zeigte sich in der SIDS-Gruppe eine signifikante Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 56,05 Zellen/mm² gegenüber 0,00 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,03$) (Abbildung 4).

Weiterhin bestand ein nicht signifikanter Trend in der Abnahme der Gesamtzellzahl von 295,91 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 226,62 Zellen/mm² ($p=0,36$) in der SIDS-Gruppe.

In der *Capsula interna* wurden ebenfalls in den Hsp70-positiven Zellen signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt. Bei den Hsp70-positiven Zellen zeigte

sich in der SIDS-Gruppe eine signifikante Zunahme auf 78,24 Zellen/mm² gegenüber 1,48 Zellen/mm² ($p=0,01$) in der Kontrollgruppe.

Bei der Gesamtzellzahl ergab sich ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme von 222,44 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 283,51 Zellen/mm² ($p=0,25$) in der SIDS-Gruppe.

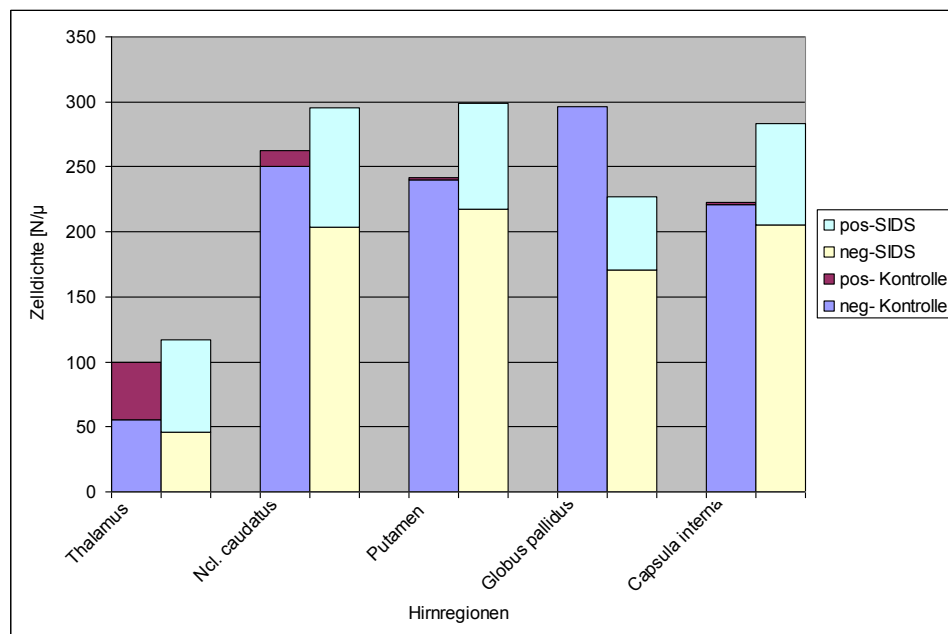


Abbildung 4: Thalamus, Basalganglien und Capsula interna

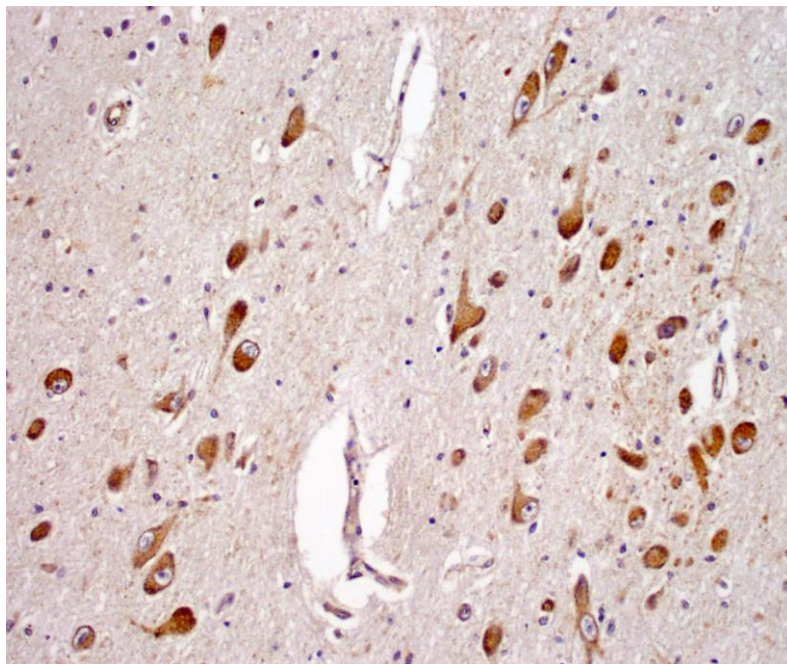


Bild 3: Immunhistochemische Darstellung von Hsp 70 im Globus pallidus bei SIDS

(Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

Zusammenfassend fand sich in Putamen und Globus pallidus sowie der Capsula interna eine signifikante Zunahme bei den Hsp70-positiven Zellen, während die Hsp70-negativen Zellen und die Gesamtzellzahl jeweils einen nicht signifikanten Trend bei den beiden Gruppen aufweisen.

3.2.4. Cerebellum

Im *Cortex cerebelli* zeigte sich in der SIDS-Gruppe eine Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 172,73 Zellen/mm² gegenüber 82,55 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,04$), sowie eine geringfügige Zunahme der Gesamtzellzahl von 306,17 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 309,11 Zellen/mm² ($p=0,77$) in der SIDS-Gruppe (Abbildung 5).

Im *Nucleus dentatus* ergab sich ein in der SIDS-Gruppe nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 127,05 m⁻² Zellen/mm² gegenüber 115,98 Zellen/mm² ($p=0,70$) in der Kontrollgruppe, sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 151,38 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 168,62 Zellen/mm² ($p=0,24$) in der SIDS-Gruppe (Abbildung 5, Bild 4).

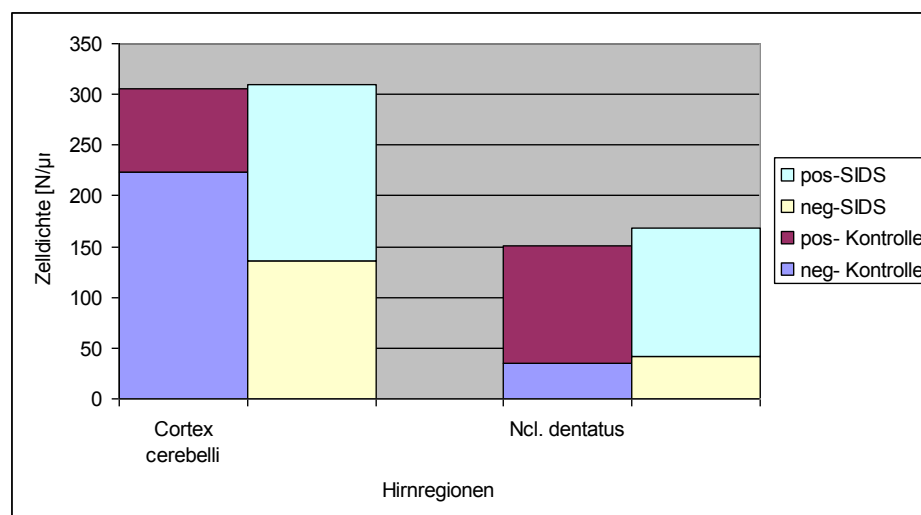


Abbildung 5: Cerebellum

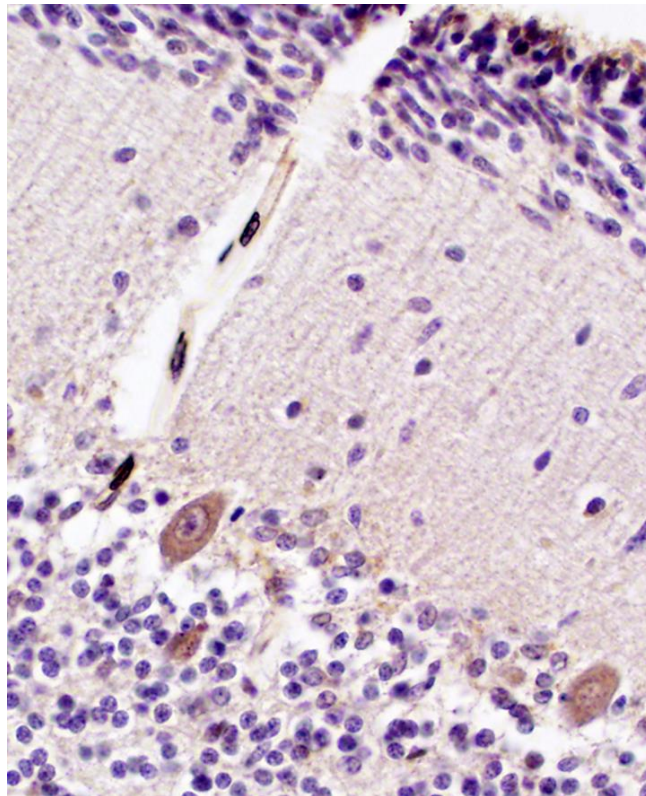


Bild 4: Immunhistochemische Darstellung von Hsp 70 in Purkinjezellen bei SIDS

(Gegenfärbung mit Hämalaun, Originalvergrößerung 400x)

Trotz statistisch signifikanter Zunahme der Hsp70-positiven Zellen in der SIDS-Gruppe im Cortex cerebelli, zeigt sich im restlichen Cerebellum lediglich ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme bei den beiden Gruppen.

3.2.5 Mesencephalon

Im *Mesencephalon* ergab sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Zunahme der Hsp70-positiven Zellen auf 96,01 Zellen/mm² gegenüber 70,65 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,50$), sowie eine Abnahme der Gesamtzellzahl von 161,41 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 160,87 Zellen/mm² ($p=0,30$) in der SIDS-Gruppe (Abbildung 6).

3.2.6. Pons und Nucleus olivaris inferior

Im **Pons** zeigte sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Abnahme der Hsp70-positiven Zellen auf 143,56 Zellen/mm² gegenüber 149,23 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,68$), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 185,40 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 191,33 Zellen/mm² ($p=0,92$) in der SIDS-Gruppe (Abbildung 6).

Im **Nucleus olivaris inferior** ergab sich in der SIDS-Gruppe ein nicht signifikanter Trend in der Abnahme der Hsp70-positiven Zellen auf 278,57 Zellen/mm² gegenüber 296,32 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe ($p=0,96$), sowie eine Zunahme der Gesamtzellzahl von 409,31 Zellen/mm² in der Kontrollgruppe gegenüber 435,38 Zellen/mm² ($p=0,33$) in der SIDS-Gruppe (Abbildung 6).

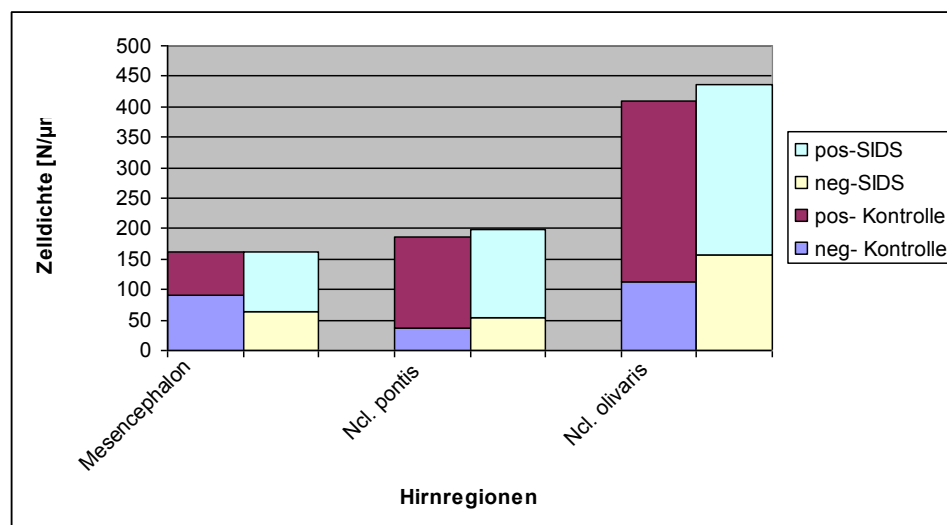


Abbildung 6: Mesencephalon, Ncl. pontis et olivaris inferior

4. DISKUSSION

4.1. Stichprobengröße

Die Stichprobengröße in dieser Arbeit betrug $n = 42$, es handelte sich um 27 SIDS-Fälle und 15 Kontrollfälle. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant der postmortalen Liegezeit (*siehe Tabelle 3 im Anhang*). Die Kontrollgruppe wies im Vergleich zu den SIDS-Fällen allerdings ein höheres Durchschnittsalter auf, was aufgrund der geringen Sterblichkeit an Nicht-SIDS Fällen in sehr jungem Alter nicht zu vermeiden war.

Unterschiede, wenngleich nicht signifikant, ergaben sich beim Hirngewicht ($p = 0,23$). Signifikante Unterschiede zeigten sich in Geburtsgewicht und Geburtslänge. Die SIDS-Fälle waren deutlich kleiner (67,98 cm; $p = 0,00$) und leichter (5305,59 g; $p = 0,00$) als die Kontrollfälle.

Als Todesursache wurde SIDS erst diagnostiziert, nachdem alle anderen Ursachen für den Tod des Kindes ausgeschlossen waren und die internationalen Kriterien für die Diagnose SIDS erfüllt wurden. Die Todesursachen der Kinder der Kontrollgruppe waren bekannte und genau definierte Ursachen.

Die Studie wurde als Blindstudie durchgeführt, so dass keine Rückschlüsse auf die Gruppenverteilung möglich waren, ebenso erfolgte die Auswertung der untersuchten Daten in Unkenntnis der Gruppenzugehörigkeit. Erst nach Auswertung der Ergebnisse stellte sich die Verteilung auf die zwei Gruppen heraus.

4.2. Material und Methoden

Die in dieser Studie verwendeten Untersuchungen und Nachweismethoden basieren auf einem etablierten sensitiven Verfahren zur Identifizierung des markierten Zellantigens. Hierzu wurden die endogenen wie exogenen Faktoren, welche die Studienergebnisse hätten beeinflussen können, berücksichtigt und gezielt auf ein Minimum reduziert.

Einer der nicht beeinflussbaren Faktoren war die postmortale Liegezeit, d.h. die Zeitspanne zwischen Todeseintritt und Obduktionszeitpunkt der verstorbenen Kinder, welche vom notwendigen Genehmigungsverfahren zur Obduktion abhängig war. Weiterhin war der aus den Ermittlungsunterlagen entnommene Zeitpunkt der Todesfeststellung nicht in jedem Fall

der tatsächliche Sterbezeitpunkt, da insbesondere bei den SIDS-Kindern zwischen dem Schlafenlegen und der Totauffindung ein nicht exakt bestimmbarer Zeitraum gelegen haben könnte.

Die postmortale Liegezeit sollte idealerweise möglichst kurz sein, um einer Artefaktbildung vorzubeugen. Daher wurden in die Studie nur die Fälle eingeschlossen, welche die entsprechenden Mindestkriterien aufwiesen: keine Autolyse, vergleichbare postmortale Liegezeit zwischen Kontrollgruppe und den SIDS-Fällen. In der Studie von *Nogami et al. (1999)* fand sich allerdings keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem antemortalen und dem postmortalen Intervall (Tode und Obduktion) mit dem Prozentsatz positiver zytoplasmatischer Hsp70-Immunoreaktivität.

Von den Studienfällen wurden die Proben direkt während der Obduktion in gepuffertes Formalin eingelegt. Im weiteren Verlauf verblieben die Proben annähernd gleich lang in Formalin, womit ein möglicher Einfluss von unterschiedlichen Fixierungszeiten minimiert wurde.

Um eine ordnungsgemäße, fehlerfreie Untersuchung und Auswertung zu gewährleisten wurden die Präparate unter gleichartigen Arbeitsbedingungen bearbeitet.

Vor Beginn der immunhistochemischen Färbungen wurde eine Verdünnungsreihe zur Ermittlung der optimalen Verdünnung ermittelt. Bei jedem Färbedurchgang wurde auch eine Negativkontrolle zur Überprüfung der Reaktionsspezifität mitgeführt.

Die Anfärbung erfolgte bei allen Proben unter gleichen Bedingungen, entsprechend den vorgeschriebenen Inkubationszeiten, Verdünnungen und pH-Werten. Die Parameter und Ergebnisse der Messungen wurden detailliert in Arbeitsprotokollen dokumentiert.

Um die äußeren Einflussfaktoren besser zu kontrollieren und zu minimieren wurden die Färbungen, Messungen und mikroskopische Auswertungen unter annähernd identischen Bedingungen im gleichen Labor unter gleichen Lichtverhältnissen durchgeführt. Es wurden die Reagenzien verwendet, welche unter kontrolliert gleichen Bedingungen aufbewahrt wurden.

Die äußeren Temperaturschwankungen wurden ebenfalls minimiert indem die Durchführung einer Färbung an der parallel bearbeiteten SIDS- und Kontrollgruppe jeweils an einem Tag durchgeführt wurde.

Die mikroskopischen Auswertungen erfolgten an einem festen Arbeitsplatz mit konstanter Beleuchtung zu möglichst den gleichen Tageszeiten.

Durch diese Maßnahmen konnten die endogenen sowie die exogenen Störeinflüsse minimiert werden.

4.3. Hsp70

Über die Expression von Hsp70 in forensischen Fällen gibt es bislang nur wenige Arbeiten, die sich überwiegend mit Erwachsenen beschäftigt haben (*Kitamura, 1994; Nogami et al., 1999*). Bei SIDS-Fällen liegt bislang nur eine Untersuchung von Nierengewebe vor, die keine erhöhte Expression von Hsp70 nachweisen konnte (*Doberentz et al., 2011*).

In dieser Studie sollte das Vorkommen des Hsp70-Proteins in verschiedenen Hirnregionen bei SIDS-Fällen im Vergleich zu Kontrollen untersucht werden, unter der Arbeitshypothese, dass bei SIDS eine morphologisch nachweisbare Hsp70-Expression vorliegt, da dieses u.a. nach Hyperthermie und ischämisch/hypoxischen Schädigungen auftritt (*Welch & Brown, 1996*), Bedingungen die vielfach bei SIDS beobachtet werden.

Von den insgesamt 24 untersuchten Hirnregionen zeigte sich bei den SIDS-Fällen in 21 Regionen eine Zunahme der Hsp70-positiven Neuronen. In fünf dieser Regionen ergaben sich signifikante Unterschiede: Hippokampus CA1 ($p=0,01$), Putamen ($p=0,04$), Globus pallidus ($p=0,03$), Capsula interna ($p=0,01$) und Cortex cerebelli ($p=0,04$).

Ein nicht signifikanter Trend in der Abnahme der Hsp70-positiven Neuronen bei den SIDS-Fällen im Vergleich zu den Kontrollen wurde in den drei Regionen fronto-orbital weiße Substanz, Pons und Nucleus olivaris inferior beobachtet.

Somit ergibt sich eine annähernd generalisierte Zunahme der Hsp70 positiven Neuronen in 21 von insgesamt 24 untersuchten Hirnregionen als Ausdruck einer gesteigerten Hsp70-Proteinexpression bei SIDS. Diese könnte ein Hinweis auf einen antemortalen Stressfaktor, wie z.B. Hypoxie oder Hyperthermie sein, wie er in vorausgegangenen Studien (*Kitamura, 1994; Nogami et al., 1999*), ohne die Stressart oder -dauer näher zu bezeichnen, aufgezeigt wurde. Die Bestimmung signifikanter Werte in nur fünf der untersuchten Regionen zeigt jedoch an, dass sich Hsp70, trotz seiner gesteigerten Expression, nicht als diagnostisch wegweisender Marker für SIDS eignet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von der Arbeitshypothese, dass es bei SIDS aufgrund der häufig zu beobachtenden präterminalen Hyperthermie und Hypoxie zu einer morphologisch nachweisbaren Expression von Hsp70 kommt, erfolgte die Zusammenstellung einer Gruppe verstorbener SIDS- und Kontrollfällen und die immunhistochemische Untersuchung von 24 Gehirnregionen mit einem Antikörper gegen das Hsp70 auf lichtmikroskopischer Ebene.

Es zeigte sich in der SIDS-Gruppe in den Basalganglien (Putamen, Globus pallidus), der Capsula interna, dem Cortex cerebelli und im Hippocampus eine statistisch signifikante Zunahme der Hsp70-positiven Neuronen im Vergleich zu den Kontrollen. In den anderen untersuchten Regionen war überwiegend ein Trend in der Zunahme festzustellen.

Die Resultate dieser Studie unterstützen zwar die Hypothese, dass diverse Stressfaktoren bei verschiedenen Todesursachen eine vermehrte Hsp70 Produktion hervorrufen, Hsp 70 allerdings nicht als diagnostisch wegweisender Marker für SIDS geeignet ist.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adams EJ, Chavez GF, Steen D, Shah R, Iyasu S, Krous HF. Changes in the epidemiologic profile of sudden infant death syndrome as rates decline among California infants: 1990–1995. *Pediatrics* 102: 1445-1451, 1998.

Adams MM. The descriptive epidemiology of sudden infant deaths among natives and whites in Alaska. *Am J Epidemiol* 122: 637-643, 1985.

Agashe VR, Hartl FU. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* 11: 15-25, 2000.

Alessandri LM, Read AW, Burton PR, Stanley FJ. An analysis of sudden infant death syndrome in aboriginal infants. *Early Hum Dev* 45: 235-244, 1996.

American Academy of Pediatrics Task Force on Infant Positioning and SIDS Positioning and SIDS. *Pediatrics* 89: 1120-1126, 1992.

Arnestad M, Vege A, Rognum TO. Evaluation of diagnostic tools applied in the examination of sudden unexpected deaths in infancy and early childhood. *Forensic Sci Int* 125: 262-268, 2002.

Beal S, Porter C. Sudden infant death syndrome related to climate. *Acta Paediatr Scand* 80: 278-287, 1991.

Beal S, Need M, Byard RW. Which infants are no longer dying because of avoidance of prone sleeping? (Letter.). *Med J Aust* 160: 660, 1994.

Becker LE, Takashima S. Chronic hypoventilation and development of brainstem gliosis. *Neuropediatrics* 16: 19-23, 1985.

Becker LE. Neural maturational delay as a link in the chain of events leading to SIDS. *Can J Neurol Sci* 17: 361-371, 1990.

Becker LE, Zhang W. Vagal nerve complex in normal development and sudden infant death syndrome. *Can J Neurol Sci* 23: 24-33, 1996.

Beckwith JB. Intrathoracic petechial hemorrhages: a clue to the mechanism of death in sudden infant death syndrome? *Ann NY Acad Sci* 533: 37-47, 1988.

Beckwith JB. A proposed new definition of sudden infant death syndrome. In: Walker AM, McMillen C (eds). *Second SIDS International Conference*. NY: Perinatology Press, pp 421-424, 1993.

Becroft DM, Lockett BK. Intra-alveolar pulmonary siderophages in sudden infant death: a marker for previous imposed suffocation. *Pathology* 29: 60-63, 1997.

Bergman AB, Beckwith JB, Ray CG (eds). Sudden infant death syndrome. Proceedings of the Second International Conference on causes of sudden death in infants. University of Washington Press, Seattle, pp 17-18, 1970.

Bergstrom L, Lagercrantz H, Terenius L. Post-mortem analysis of neuropeptides in brains from sudden infant death victims. *Brain Res* 323: 279-285, 1984.

Berry PJ. Pathological findings in SIDS. *J Pathol* 45 Suppl: 11-16, 1992.

Biondo B, Magagnin S, Bruni B, Cazzulo A, Tosi D, Matturri L. Glial and neuronal alterations in the nucleus tractus solitarii of sudden infant death syndrome victims. *Acta Neuropathol* 108: 309-318, 2004.

Blair PS, Fleming PJ, Bensley D, Smith I, Bacon C, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp J. Smoking and the sudden infant death syndrome: results from 1993–5 case control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy. *BMJ* 313: 195-198, 1996.

Blackwell CC, Weir DM, Busuttill A. Infectious agents, the inflammatory responses of infants and sudden infant death syndrome (SIDS). *Mol Med Today* 1: 72-78, 1995.

Blackwell CC, Weir DM, Busuttill A. Infectious agents and SIDS: analysis of risk factors and preventative measures. *J SIDS Infant Mort* 2: 61-76, 1997.

Blackwell CC, Weir DM, Busuttill A. A microbiological perspective. In: Byard RW, Krous HF (eds). *Sudden Infant Death Syndrome: Problems, Progress and Possibilities*. London: Arnold 182-208, 2001.

Boenisch T. *Handbuch Immunchemische Färbemethoden*. 3. Auflage. DakoCytomation GmbH, Hamburg, 2003.

Bright FM, Vink R, Byard RW. The potential role of substance P in brainstem homeostatic control in the pathogenesis of sudden infant death syndrome (SIDS). *Neuropeptides* 70:1-8, 2018.

Broadbelt KG, Paterson DS, Belliveau RA, Trachtenberg FL, Haas EA, Stanley C, Krous HF, Kinney HC. Decreased GABAA receptor binding in the medullary serotonergic system in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 799-810, 2011.

Brown IR. Induction of heat shock (stress) genes in the mammalian brain by hyperthermia and other traumatic events: A current perspective. *J Neurosci Res* 27: 247-255, 1990.

Bukau B, Weissman J, Horwich A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* 125: 443-451, 2006.

Byard RW. Possible mechanisms responsible for the sudden infant death syndrome. *J Paediatr. Child Health* 27: 147-157, 1991.

Byard RW. Hazardous infant and early childhood sleeping environments and death scene examination. *J Clin Forensic Med* 3: 115-122, 1996.

Byard RW, Cohle SD. Sudden Death in Infancy, Childhood and Adolescence. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

Byard RW, Krous HF. Petechial hemorrhages and unexpected infant deaths. *Legal Med* 1: 193-197, 1999.

Byard RW, Krous HF (eds). Sudden Infant Death Syndrome: Problems, Progress and Possibilities. Arnold, London, 2001.

Byard RW, Krous HF. Sudden infant death syndrome: Overview and update. *Pediatr Dev Pathol* 6: 112-127, 2003.

Byard RW, Moore L, Bourne AJ, Lawrence AJ, Goldwater PN. Clostridium botulinum and sudden infant death syndrome: A 10 year prospective study. *J Paediatr Child Health* 28: 156-157, 1992.

Byard RW, MacKenzie J, Beal SM. Immunization and sudden infant death syndrome in South Australia - report from the South Australian SIDS database. *Curr Top Forensic Sci* 3: 278-279, 1997.

Byard RW, James RA, Felgate P. Detecting organic toxins in possible fatal poisonings - a diagnostic problem. *J Clin Forensic Med* 9: 85-88, 2002.

Byard RW et al. Sudden death in the young, 3. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

Carmichael EM, Goldwater PN, Byard RW. Routine microbiological testing in sudden and unexpected infant death. *J Paediatr. Child Health* 32: 412-415, 1996.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for death scene investigation of sudden unexplained infant deaths. Recommendations of the Interagency Panel on Sudden Infant Death Syndrome. *MMWR* 45: 1-22, 1996.

Chavez CJ, Ostrea EM, Stryker JC, Smialek Z. Sudden infant death syndrome among infants of drug-dependent mothers. *J Pediatr* 95: 407-409, 1979.

Chen J, Graham SH, Zhu RL, Simon RP. Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 566-577, 1996.

Chigr F, Najimi M, Jordan D, Denoroy L, Pearson J, Tommasi M, Gilly R, Kopp N. Immunohistochemical absence of adrenergic neurons in the dorsal part of the solitary tract nucleus in sudden infant death. *C R Acad Sci III* 309: 543-549, 1989.

Chigr F, Jordan D, Najimi M, Denoroy L, Sarrieau A, de Broca A, Rostene W, Epelbaum J, Kopp N. Quantitative autoradiographic study of somatostatin and neurotensin binding sites in medulla oblongata of SIDS. *Neurochem Int* 20: 113-118, 1992.

Coquerel A, Buser M, Tayot J, Pfaff F, Matray F, Proust B. Beta-endorphin and neurotensin in brainstem and cerebrospinal fluid in the sudden infant death syndrome. *Neurochem Int* 20: 97-102, 1992.

Cordner SM, Willinger M. The definition of the sudden infant death syndrome. In: Rognum TO, ed. *Sudden Infant Death Syndrome: New Trends in the Nineties*. Oslo: Scandinavian University Press: pp 18-20, 1995.

Cornwell AC, Feigenbaum P, Kim A. SIDS, abnormal nighttime REM sleep and CNS immaturity. *Neuropediatrics* 29: 72-79, 1998.

Daltveit AK, Irgens LM, Øyen N, Skjaerven R, Markestad T, Alm B, Wennergren G, Norvenius G, Helweg-Larsen K. Sociodemographic risk factors for sudden infant death syndrome: associations with other risk factors. The Nordic Epidemiologic SIDS Study. *Acta Paediatr Scand* 87: 284-290, 1998.

Denoroy L, Gay N, Gilly R, Tayot J, Pasquier B, Kopp N. Catecholamine synthesizing enzyme activity in brainstem areas from victims of sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 18: 187-190, 1987.

Doberentz E, Gennep L, Madea B. Plötzlicher Säuglingstod Keine renale Hitzeschockproteinexpression. *Rechtsmedizin* 21: 521-526, 2011.

Douglas AS, Alexander E, Allan TM, Helms PJ. Seasonality of birth in sudden infant death syndrome. *Scot Med J* 41: 39-43, 1996.

Duncan JR, Paterson DS, Hoffman JM, Mokler DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE, Trachtenberg FL, Kinney HC. Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *JAMA* 303: 430-437, 2010.

Dwyer T, Ponsonby A-L, Blizzard L, Newman NM, Cochrane JA. The contribution of changes in the prevalence of prone sleeping position to the decline in sudden infant death syndrome in Tasmania. *JAMA* 273: 783-789, 1995.

Erck Lambert AB, Parks SE, Camperlengo L, Cottengim C, Anderson RL, Covington TM, Shapiro-Mendoza CK. Death scene investigation and autopsy practices in sudden unexpected infant deaths. *J Pediatr* 174: 84-90.e1, 2016.

Ferriero DM, Soberano HQ, Simon RP, Sharp FR. Hypoxia-ischaemia induces heat shock protein-like (HSP72) immunoreactivity in neonatal rat brain. *Dev Brain Res* 53: 145-150, 1990.

Filiano JJ, Kinney HC. Arcuate nucleus hypoplasia in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 394-403, 1992.

Filiano JJ, Kinney HC. A perspective on neuropathologic findings in victims of the sudden infant death syndrome: the triple-risk model. *Biol Neonate* 65: 194-197, 1994.

Firstman R, Talan J. SIDS and infanticide. In: Byard RW, Krous HF (eds). Sudden Infant Death Syndrome: Problems, Progress and Possibilities. London: Arnold: pp 291-300, 2001.

Fleming PJ, Blair PS, Bacon C, Bensley D, Smith I, Taylor E, Berry J, Golding J, Tripp J. Environment of infants during sleep and the risk of sudden infant death syndrome: results of 1993–95 case-control study for confidential inquiry into stillbirths and deaths in infancy. *BMJ* 313: 191-195, 1996.

Franco P, Pardou A, Hassid S, Lurquin P, Groswasser J, Kahn A. Auditory arousal thresholds are higher when infants sleep in the prone position. *J Pediatr* 132: 240-243, 1998.

Garcia AJ, Koschnitzky JE, Ramirez J-MM. The physiological determinants of sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 189: 288-300, 2013.

Gibson E, Cullen JA, Spinner S, Rankin K. Infant sleep position following new AAP guidelines. *Pediatrics* 96: 69-72, 1995.

Gilbert R, Rudd P, Berry PJ, Fleming PJ, Hall E, White DG, Oreffo VO, James P, Evans JA. Combined effect of infection and heavy wrapping on the risk of sudden unexpected infant death. *Arch Dis Child* 67: 171-177, 1992.

Gonzalez MF, Shiraishi K, Hisanaga K, Sagar SM, Mandabach M, Sharp FR. Heat shock proteins as markers of neural injury. *Mol Brain Res* 6: 93-100, 1989.

Guntheroth WG, Spiers PS. The triple risk hypothesis in sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 110: e64, 2002.

Gupta R, Helms PJ, Jolliffe IT, Douglas AS. Seasonal variation in sudden infant death syndrome and bronchiolitis – a common mechanism? *Am J Respir Crit Care Med* 154: 431-435, 1996.

Harper RM, Leake B, Hoffman H, Walter DO, Hoppenbrouwers T, Hodgman J, Sterman MB. Periodicity of sleep states is altered in infants at risk for the sudden infant death syndrome. *Science* 213: 1030-1032, 1981.

Harper RM, Kinney HC. Potential mechanisms of failure in the sudden infant death syndrome. *Curr Pediatr Rev* 6: 39-47, 2010.

Hauck FR. Changing epidemiology. In: Byard RW, Krous HF (eds). Sudden Infant Death Syndrome: Problems, Progress and Possibilities. London: Arnold: pp 31-57, 2001.

Hoffman HJ (eds) Sudden infant death syndrome: risk factors and basic mechanisms. PMA, New York, 1988.

Hoffman HJ, Hillman LS. Epidemiology of the sudden infant death syndrome: maternal, neonatal and postneonatal risk factors. *Clin Perinatol* 19: 717-737, 1992.

Hyman BT, Van Hoesen GW, Wolozin BL, Davies P, Kromer LJ, Damasio AR. ALZ-50 antibody recognizes Alzheimer-related neuronal changes *Ann Neurol* 23: 371-379, 1988.

Irwin KL, Mannino S, Daling J. Sudden infant death syndrome in Washington state: why are Native American infants at greater risk than white infants? *J Pediatr* 121: 242-247, 1992.

Jones AM, Weston JT. The examination of the sudden infant death syndrome infant: investigative and autopsy protocols. *J Forensic Sci* 21: 833-841, 1976.

Jordan D, Kermadi I, Rambaud C, Bouvier R, Dijoud F, Martin D, Kopp N. Autoradiographic distribution of brainstem substance P binding sites in humans: ontogenic study and relation to sudden infant death syndrome (SIDS). *J Neural Transm* 104: 1101-1105, 1997.

Kadhim H, Deltenre P, De Prez C, Sébire G. Interleukin-2 as a neuromodulator possibly implicated in the physiopathology of the sudden infant death syndrome. *Neurosci Lett* 480:122-126, 2010.

Kahn A, Riazi J, Blum D. Oculocardiac reflex in near miss for sudden infant death syndrome infants. *Pediatrics* 71: 49-52, 1983.

Kahn A, Groswasser J, Rebuffat E, Sottiaux M, Blum D, Foerster M, Franco P, Bochner A, Alexander M, Bachy A. Sleep and cardiorespiratory characteristics of infant victims of sudden death: a prospective case-control study. *Sleep* 15: 287-292, 1992.

Kahn A, Franco P, Scaillet S, Groswasser J, Dan B. Development of cardiopulmonary integration and the role of arousability from sleep. *Curr Opin Pulm Med* 3: 440-444, 1997.

Kandall SR, Gaines J, Habel L, Davidson G, Jessop D. Relationship of maternal substance abuse to subsequent sudden infant death syndrome in offspring. *J Pediatr* 123: 120-126, 1993.

Kinney HC. Neuropathology provides new insights in the pathogenesis of the sudden infant death syndrome. *Acta Neuropathol* 117: 247-255, 2009.

Kinney HC, Thach BT. The sudden infant death syndrome. *N Engl J Med* 361: 795-805, 2009.

Kinney HC, Burger PC, Harrell FE, Hudson RP. 'Reactive gliosis' in the medulla oblongata of victims of the sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 72: 181-187, 1983.

Kinney HC, Filiano JJ, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, White WF. Decreased muscarinic receptor binding in the arcuate nucleus in sudden infant death syndrome. *Science* 269: 1446-1450, 1995.

Kitamura O. Immunohistochemical investigation of hypoxic/ischemic brain damage in forensic autopsies cases. *Int J Leg Med* 107: 69-76, 1994.

Kleemann WJ, Hiller AS, Tröger HD. Infections of the upper respiratory tract in cases of sudden infant death. *Int J Legal Med* 108: 85-89, 1995.

Kleemann WJ, Schlaud M, Poets CF, Rothämel T, Tröger HD. Hyperthermia in sudden infant death. *Int J Legal Med* 109: 139-142, 1996.

Kopp N, Chigr F, Denoroy L, Gilly R, Jordan D. Absence of adrenergic neurons in nucleus tractus solitarius in sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 24: 25-29, 1993.

Krous HF. Pathological considerations of sudden infant death syndrome. *Pediatrician* 15: 231-239, 1988.

Krous HF. An international standardised autopsy protocol for sudden unexpected infant death. In: Rognum TO, ed. *Sudden Infant Death Syndrome: New Trends in the Nineties*. Oslo: Scandinavian University Press: pp 81-95, 1995.

Krous HF, Byard RW. International standardized autopsy protocol for sudden unexpected infant death. Appendix I. In: Byard RW, Krous HF (eds). *Sudden Infant Death Syndrome: Problems, Progress and Possibilities*. London: Arnold: pp 319-333, 2001.

Krous HF, Jordan J. A necropsy study of distribution of petechiae in non-sudden infant death syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 108: 75-76, 1984.

Krous HF, Nadeau JM, Byard RW, Blackbourne BD. Oronasal blood in sudden infant death. *Am J Forensic Med Pathol* 22: 346-351, 2001.

Krous HF, Nadeau JM, Fukumoto RI, Blackbourne BD, Byard RW. Environmental hyperthermic infant and early childhood death: circumstances, pathologic changes, and manner of death. *Am J Forensic Med Pathol* 22: 374-382, 2001.

Krous HF, Beckwith JB, Byard RW, Rognum TO, Bajanowski T, Corey T, Cutz E, Hanzlik R, Keens TG, Mitchell EA. Sudden infant death syndrome and unclassified sudden infant deaths: a definitional and diagnostic approach. *Pediatrics* 114: 234-238, 2004.

Kubo S, Orihara Y, Gotohda T, Tokunaga I, Tsuda R, Ikematsu K, Kitamura O, Yamamoto A, Nakasono I. Immunohistochemical studies on neuronal changes in brain stem nucleus of forensic autopsied cases. II. Sudden infant death syndrome. *Nippon Hoigaku Zasshi* 52: 350-354, 1999.

Lee NNY, Chan YF, Davies DP, Lau E, Yip DCP. Sudden infant death syndrome in Hong Kong: confirmation of low incidence. *BMJ* 298: 721, 1989.

Lindquist S. The heat shock response. *Annu Rev Biochem* 55: 1151-1191, 1986.

Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Ann Rev Genet* 22: 631-677, 1988.

Machaalani R, Waters KA. NMDA receptor 1 expression in the brainstem of human infants and its relevance to the sudden infant death syndrome (SIDS). *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1076-1085, 2003.

Machaalani R, Say M, Waters KA. Serotonergic receptor 1A in the sudden infant death syndrome brainstem medulla and associations with clinical risk factors. *Acta Neuropathol* 117: 257-265, 2008.

- Machaalani R, Waters KA. Neurochemical abnormalities in the brainstem of the sudden infant death syndrome (SIDS). *Paediatr Respir Rev* 15: 293–300, 2014.
- Mallard C, Tolcos M, Leditschke J, Campbell P, Rees S. Reduction in choline acetyltransferase immunoreactivity but not muscarinic-M2 receptor immunoreactivity in the brainstem of SIDS infants. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 255-264, 1999.
- Markestad T, Skadberg B, Hordvik E, Morild I, Irgens LM. Sleeping position and sudden infant death syndrome (SIDS): effect of an intervention programme to avoid prone sleeping. *Acta Paediatr Scand* 84: 375-378, 1995.
- Meadow R. Unnatural sudden infant death. *Arch Dis Child* 80: 7-14, 1999
- Milroy CM. Munchausen syndrome by proxy and intraalveolar haemosiderin. *Int J Legal Med* 112: 309-312, 1999.
- Mitchell EA. Smoking: the next major and modifiable risk factor. In: Rognum TO, ed. *Sudden Infant Death Syndrome, New Trends in the Nineties*. Oslo: Scandinavian University Press: pp 114-118, 1995.
- Mitchell EA, Ford RPK, Taylor BJ, Stewart AW, Becroft DM, Scragg R, Barry DM, Allen EM, Roberts AP, Hassall IB. Further evidence supporting a causal relationship between prone position and SIDS. *J Paediatr Child Health* 28, Suppl 1: S9-S12, 1992.
- Mitchell EA, Stewart AW, Scragg R, Ford RP, Taylor BJ, Becroft DM, Thompson JM, Hassall IB, Barry DM, Allen EM, Roberts AP. Ethnic differences in mortality from sudden infant death syndrome in New Zealand. *BMJ* 306: 13-16, 1993.
- Mitchell EA, Brunt JM, Everard C. Reduction in mortality from sudden infant death syndrome in New Zealand: 1986–1982. *Arch Dis Child* 70: 291-294, 1994.
- Mitchell E, Krous HF, Donald T, Byard RW. Changing trends in the diagnosis of sudden infant death. *Am J Forensic Med Pathol* 21: 311-314, 2000.
- Mitchell E, Krous HF, Donald T, Byard RW. An analysis of the usefulness of specific stages in the pathological investigation of sudden infant death. *Am J Forensic Med Pathol* 21: 395-400, 2000.
- Mitchell RA Jr, DiAngelo C, Morgan D. Medicolegal death investigation of sudden unexpected infant deaths. *Pediatr Ann* 46: e297-e302, 2017.
- Moon RY, Horne RSC, Hauck FR. Sudden infant death syndrome. *Lancet* 370: 1578-1587, 2007.
- Morris JA. The common bacterial toxins hypothesis of sudden infant death syndrome. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 11-17, 1999.

- Nachmanoff DB, Panigrahy A, Fillano JJ, Mandell F, Sleeper LA, Valdes-Dapena M, Krous HF, White WF, Kinney HC. Brainstem 3H-nicotine receptor binding in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1018-1025, 1998.
- Naeye RL, Whalen P, Ryser M. Cardiac and other abnormalities in the sudden infant death syndrome. *Am J Pathol* 82: 1-8, 1976.
- Nelson EAS, Taylor BJ, Weatherall IL. Sleeping position and infant bedding may predispose to hyperthermia and the sudden infant death syndrome. *Lancet* 1: 199-201, 1989.
- Nishimura RN, Dwyer BE. Evidence for different mechanisms of induction of HSP70i: a comparison of cultured rat cortical neurons with astrocytes. *Mol Brain Res* 36: 227-239, 1996.
- Nogami M, Takatsu A, Endo N, Ishiyama I. Immunohistochemical localisation of heat shock protein 70 in the human medulla oblongata in forensic autopsies. *Legal Med* 1: 198-203, 1999.
- Obonai T, Takashima S, Becker LE, Asanuma M, Mizuta R, Horie H, Tanaka J. Relationship of substance P and gliosis in medulla oblongata in neonatal sudden infant death syndrome. *Pediatr Neurol* 15: 189-192, 1996.
- Oehmichen M, Theuerkauf I, Bajanowski T, Merz H, Meissner C. Enhanced reactivity of Alz-50 antibody in brains of sudden infant death syndrome victims versus brains with lethal hypoxic/ischemic injury. Diagnostic significance after application of the ImmunoMax technique on routine paraffin material. *Acta Neuropathol* 95: 280-286, 1998.
- O'Kusky JR, Norman MG. Sudden infant death syndrome: increased synaptic density in the central reticular nucleus of the medulla. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 263-271, 1994.
- Øyen N, Bulterys, Welty TK, Kraus JF. Sudden unexplained infant deaths among American Indians and whites in North and South Dakota. *Paediatr Perinatal Epidemiol* 4: 175-183, 1990.
- Paine SML, Jacques TS, Sebire NJ. Review: Neuropathological features of unexplained sudden death in infancy: current evidence and controversies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40: 364-384, 2014.
- Panigrahy A, Fillano J, Sleeper LA, Mandell F, Valdes-Dapena M, Krous HF, Rava LA, Foley E, White WF, Kinney HC. Decreased serotonergic receptor binding in rhombic lipderived regions of the medulla oblongata in the sudden infant death syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 377-384, 2000.
- Pardue S, Wang S, Miller MM, Morrison-Bogorad M. Elevated levels of inducible heat shock 70 proteins in human brain. *Neurobiol Aging* 28: 314-324, 2007.
- Pavlik A, Aneja IS, Lexa J, Baker A, Al Zoabi. Identification of cerebral neurons and glial cell types inducing heat shock protein Hsp 70 following heat stress in the rat. *Brain Res* 973: 179-189, 2003.

- Peterson DR, van Belle G, Chinn NM. Sudden infant death syndrome and maternal age: etiologic implications. *JAMA* 247: 2250-2252, 1982.
- Peterson D. *The Epidemiology of Sudden Infant Death Syndrome*, 1st ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1988.
- Poets CF, Meny RG, Chobanian MR, Bonofiglio RE. Gasping and other cardiorespiratory patterns during sudden infant deaths. *Pediatr Res* 45: 350-354, 1999.
- Ponsonby A-L, Dwyer T, Gibbons LE, Cochrane JA, Jones ME, McCall MJ. Thermal environment and sudden infant death syndrome: case control study. *BMJ* 304: 277-282, 1992.
- Ponsonby A-L, Dwyer T, Gibbons LE, Cochrane JA, Wang YG. Factors potentiating the risk of sudden infant death syndrome associated with the prone position. *N Engl J Med* 329: 377-382, 1993.
- Quattrocchi JJ, McBride PT, Yates AJ. Brainstem immaturity in sudden infant death syndrome: a quantitative rapid Golgi study of dendritic spines in 95 infants. *Brain Res* 325: 39-48, 1985.
- Ramnaud C, Guilleminault C, Campbell PE. Definition of the sudden infant death syndrome. *BMJ* 308: 1439, 1994.
- Rognum TO (ed.). *Sudden Infant Death Syndrome: New Trends in the Nineties*. Scandinavian University Press, Oslo, 1995.
- Rognum TO. Definition and pathologic features. In: Byard RW, Krous HF (eds). *Sudden Infant Death Syndrome: Problems, Progress and Possibilities*. London: Arnold: pp 4-30, 2001.
- Sawaguchi T, Patricia F, Kadhim H, Groswasser J, Sottiaux M, Nishida H, Kahn A. Clinicopathological correlation between brainstem gliosis using GFAP as a marker and sleep apnea in the sudden infant death syndrome. *Early Hum Dev* 75: S3-11, 2003.
- Schechtman VL, Harper RK, Harper RM. Aberrant temporal patterning of slow-wave sleep in siblings of SIDS victims. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 94: 95-102, 1995.
- Schechtman VL, Lee MY, Wilson AJ, Harper RM. Dynamics of respiratory patterning in normal infants and infants who subsequently died of the sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 40: 571-577, 1996.
- Scheibel ME, Davies TL, Scheibel AB. Maturation of reticular dendrites: loss of spines and development of bundles. *Exp Neurol* 38: 301-310, 1973.
- Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 265: 12111-12114; 1990.
- Schoendorf KC, Kiely JL. Relationship of sudden infant death syndrome to maternal smoking during and after pregnancy. *Pediatrics* 90: 905-908, 1992.

Schulte FJ, Albani M, Schnizer H, Bentele K. Neuronal control of neonatal respiration –sleep apnea and the sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 13: 3-14, 1982.

Sharp FR, Sagar SM. Alterations in gene expression as an index of neuronal injury: heat shock and the immediate early gene response. *NeuroToxicology* 15: 51-60, 1994.

Sharp FR, Newcomer JW, Farber NB, Olney JW. NMDA receptor function, memory, and brain aging: *Neuroscience* 62: 1079-1092, 1994.

Sharma HS, Hoopes PJ. Hyperthermia induced pathophysiology of the central nervous system. *Int J Hyperthermia* 19: 325-354, 2003.

Smith NM, Telfer SM, Byard RW. A comparison of the incidence of cytomegalovirus inclusion bodies in submandibular and tracheobronchial glands in SIDS and non-SIDS autopsies. *Pediatr Pathol* 12: 185-190, 1992.

Sparks DL, Hunsaker JC. Increased ALZ-50-reactive neurons in the brains of SIDS infants: an indicator of greater neuronal death? *J Child Neurol* 6: 123-127, 1991.

Sparks DL, Hunsaker JC. Down's syndrome: occurrence of ALZ-50 reactive neurons and the formation of senile plaques. *J Neurol Sci* 109: 77-82, 1992.

Sparks DL, Hunsaker JC. Sudden infant death: a neurodegenerative disorder. In: Bentele KHP, Kohlschütter A (eds). *Aktuelle Neuropädiatrie* 1998. Novartis Pharma, Nürnberg, 1999.

Sparks DL, Hunsaker III JC. Neuropathology of Sudden Infant Death (Syndrome): literature review and evidence of a probable apoptotic degenerative cause. *Childs Nerv Syst* 18: 586-592, 2002.

Sparks DL, Davis DG, Bigelow TM, Rasheed K, Landers TM, Liu H, Coyne CM, Hunsaker JC. Increased Alz-50 immunoreactivity in sudden infant death syndrome. *J Child Neurol* 11: 101-107, 1996.

Sridhar R, Thach BT, Kelly DH, Henslee JA. Characterization of successful and failed autoresuscitation in human infants, including those dying of SIDS. *Pediatr Pulmonol* 36: 113-122, 2003.

Stanley FJ, Byard RW. The association between the prone sleeping position and SIDS: an editorial overview. *J Paediatr Child Health* 27: 325-328, 1991.

Storm H, Nylander G, Saugstad OD. The amount of brainstem gliosis in sudden infant death syndrome (SIDS) victims correlates with maternal cigarette smoking during pregnancy. *Acta Paediatr* 88: 13-18, 1999.

Sturner WQ. Common errors in forensic pediatric pathology. *Am J Forensic Med Pathol* 19:17-20, 1998.

- Sturner WQ, Lipsitt LP, Oh W, Barrett J, Truex RC. Abnormal heart rate response during newborn sucking behavior study: subsequent sudden infant death syndrome with cardiac conduction abnormality. *Forensic Sci Int* 16: 201-212, 1980.
- Takashima S, Becker LE. Developmental abnormalities of medullary “respiratory centers” in sudden infant death syndrome. *Exp Neurol* 90: 580-587, 1985.
- Takashima S, Mito T, Becker LE. Neuronal development in the medullary reticular formation in sudden infant death syndrome and premature infants. *Neuropediatrics* 16: 76-79, 1985.
- Takashima S, Mito T, Yamanouchi H. Developmental brainstem pathology in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr Jpn* 36: 317-320, 1994.
- Tang S, Machaalani R, Waters KA. Expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB receptor in the sudden infant death syndrome brainstem. *Respir Physiol Neurobiol* 180: 25-33, 2012.
- Task Force on Infant Positioning and SIDS. Positioning and infant death syndrome (SIDS): update. *Arch Pediatr Adolesc Med* 150: 834-837, 1996.
- Thach BT. The role of respiratory control disorders in SIDS. *Respir Physiol Neurobiol* 149: 343-353, 2005.
- Thach B. Tragic and sudden death. Potential and proven mechanisms causing sudden infant death syndrome. *EMBO Rep* 9: 114-118, 2008.
- Tieder JS, Bonkowsky JL, Etzel RA, Franklin WH, Gremse DA, Herman B, Katz ES, Krilov LR, Merritt JL 2nd, Norlin C, Percelay J, Sapién RE, Shiffman RN, Smith MB. Brief resolved unexplained events (formerly apparent life-threatening events) and evaluation of lower-risk infants: Executive summary. *Pediatrics* 137:e20160591, 2016.
- Valdés-Dapena M. Sudden and unexpected death in infancy: a review of the world literature 1954-1966. *Pediatrics* 39: 123-138, 1967.
- Vass K, Welch WJ, Nowak TS. Localization of 70 kD stress protein induction in gerbil brain after ischemia. *Acta Neuropathol* 77: 128-135, 1988.
- Vege A, Rognum TO, Aasen AO, Saugstad OD. Are elevated cerebrospinal fluid levels of IL-6 in sudden unexplained deaths, infections deaths and deaths due to heart/lung disease in infants and children due to hypoxia? *Acta Paediatr* 87: 819-824, 1998.
- Wailoo MP, Peterson SA, Whitaker H. Disturbed nights and 3-4 month old infants: the effects of feeding and thermal environment. *Arch Dis Child* 65: 499-501, 1990.
- Walker AM, McMillen C (eds). *Second SIDS International Conference*. Perinatology Press, Ithaca, 1993.
- Waters KA, Meehan B, Huang JQ, Gravel RA, Michaud J, Côté A. Neuronal apoptosis in sudden infant death syndrome. *Pediatr Res* 45: 166-172, 1999.

Wedgewood RJ, Benditt ER (eds). Sudden death in infants. Proceedings of the Conference on Causes of Sudden Death in Infants, September 1963, Seattle, WA. US PHS Publication No. 1412, Washington, DC, 1965.

Weese-Mayer DE, Ackerman MJ, Marazita ML, Berry-Kravis EM. Sudden infant death syndrome: review of implicated genetic factors. *Am J Med Genet A* 143A, 771-788, 2007.

Weis S: Morphometry in the neurosciences. In: Wenger E, Dimitrov L (Hrsg.): Digital image processing and computer graphics: Theory and application. R. Oldenbourg, München-Wien, S306-326, 1991.

Weissbluth L, Weissbluth M. Sudden infant death syndrome: a genetically determined impaired maturation of the photoneuroendocrine system. A unifying hypothesis. *J Theor Biol* 167:13-25, 1994.

Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell stress chaperones* 1: 109-115, 1996.

Williams SM, Taylor BJ, Mitchell EA. New Zealand Cot Death Study Group. Sudden infant death syndrome: insulation from bedding and clothing and its effect modifiers. *Int J Epidemiol* 25: 366-375, 1996.

Willinger M, James LS, Catz C. Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol* 11: 677-684, 1991.

Willinger M, Hoffman HJ, Hartford RB. Infant sleep position risk for sudden infants death Syndrome (SIDS) in the United States. *Pediatrics* 93: 820-822, 1994.

Willinger M, Hoffman HJ, Wu KT. Factors associated with the transition to nonprone sleep position in infants in the United States: the National Infant Sleep Position Study. *JAMA* 280: 329-335, 1998.

Yamanouchi H, Takashima S, Becker LE. Correlation of astrogliosis and substance P immunoreactivity in the brainstem of victims of sudden infant death syndrome. *Neuropediatrics* 24: 200-203, 1993.

7. ANHANG

7.1. Abkürzungen

ABC-Methode	Avidin-Biotin Methode
ALTE	apparent life threatening event
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BREA	brief resolved unexplained events
CA-1/CA-4-Region	Erste bzw. vierte Region des "Hippocampus proprius", entspricht dem Ammonshorn (Cornu ammonis)
CDC	Centers for Disease Control
HSP	Hitzeschockprotein
ISAP	international standardisierter Obduktionsprotokoll
MIB-1	Enzym: E3 ubiquitin-protein ligase
NAME	Nationale Assoziation für Gerichtsmedizin
NICHD	National Institut of Child Health and Human Development
PBS-Puffer	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
SIDS	sudden infant death syndrome; plötzlicher Kindstod
SUIDIRF	Sudden Unexplained Infant Death Investigation Reporting Form
TH	Tyrosinhydroxylase

7.2. SIDS-Gruppe

Alter	Geschlecht	Todesursache
1 Monat	männlich	SIDS
1 Monat	männlich	SIDS
1 Monat	weiblich	SIDS
1 Monat	weiblich	SIDS
1 Monat	weiblich	SIDS
1 Monat	weiblich	SIDS
2 Monat	weiblich	SIDS
2 ³ / ₄ Monat	weiblich	SIDS
3 Monat	männlich	SIDS
3 Monat	weiblich	SIDS
3 Monat	weiblich	SIDS
3 Monat	weiblich	SIDS
3 Monat	männlich	SIDS
3 Monat	männlich	SIDS
3 Monat	weiblich	SIDS
3 Monat	weiblich	SIDS
5 Monat	männlich	SIDS
5 Monat	männlich	SIDS
5 Monat	männlich	SIDS
7 Monat	männlich	SIDS
7 Monat	weiblich	SIDS
8 Monat	männlich	SIDS
10 Monate	männlich	SIDS
11 Monate	männlich	SIDS
11 Monate	männlich	SIDS
11 Monate	weiblich	SIDS
11 Monate	weiblich	SIDS

7.3. Kontrollgruppe – Todesursachen

Alter	Geschlecht	Todesursache
31. SSW	weiblich	Ertrinken
Neugeborenes	weiblich	Ertrinken
Neugeborenes	weiblich	Fruchtwasseraspiration
Neugeborenes	weiblich	Erwürgen
1 Monat	weiblich	Meningitis
3 ¼ Monate	männlich	Metabolisch
5 Monate	weiblich	Malformation
7 Monate	männlich	Ersticken
10 Monate	männlich	Rauchgasintoxikation
11 Monate	männlich	Ertrinken
13 Monate	weiblich	Ersticken
13 Monate	weiblich	Infektion
2 Jahre	männlich	Erstechen
5 Jahre	weiblich	Malformation
6 Jahre	weiblich	Stromtod

7.4. Chemikalien

7.4.1 Antikörper

Polyclonal Rabbit Anti-Heat Shock Protein 70 (HSP 70)

Immunogen:	Purified heat shock Protein (DnaK) from E. coli
Totalprotein concentration:	29,9 mg/ml (Refractometry)
Code No.:	A0500
LOT No.:	032
Bezugsquelle:	Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA

7.4.2. Sonstige Chemikalien

7.4.2.1. Protease (Proteinase K)

Ansatz:	20 mg in 200 ml PBS-Puffer
Bezugsquelle:	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen
No. P 8038 Typ XXIV:	bakteriell

7.4.2.2. Biotiniliertes Kaninchen Anti-Maus Immunglobulin

Verdünnung in PBS-Puffer:	1:400
Bezugsquelle:	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Code No.	E 354

7.4.2.3. Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Verdünnung in PBS-Puffer:	1:1000
Bezugsquelle:	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Code No.	E 397

7.4.2.4. Diaminobenzidin-Chromogen

Tablette:	mit 10 mg 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
Ansatz:	1 mg DAB/ml Trispuffer + 0,02% Wasserstoffperoxid
Bezugsquelle:	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg
Code No.	S 3000

7.4.2.5. PBS-Puffer

Stammlösung:

12,7 g Na₂HPO₄

3,9 g NaH₂PO₄

85,0 g NaCl

pH 7,28 -7,30

Mit Aqua destilata auf 10 Liter aufgefüllt.

7.4.2.6. Gepuffertes Formalin

Stammlösung:

34,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat

44,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Dinatriumphosphat-Dihydrat

Mit Aqua destillate auf 1 Liter aufgefüllt.

Bei 50° C 20 Minuten gerührt.

pH 6,7 - 6,8

Ansatz: Stammlösung 1:10 mit Aqua destillata verdünnen

7.5. Ergebnisse - Tabellen

Tabelle 1: Ergebnisse von SIDS vs. Kontrollen (gelbe Markierung = signifikant)

	0	Control	
		Mean	SEM
HEIGHT	16	72,94	5,63
WEIGHT	16	8,09	1,3
BRWEIGHT	16	1970,44	788,7
PMINH	16	27,13	5,44
BWEIGHT	16	8699,81	698,55
BHEIGHT	16	90,06	4,81
frocohsppos	9	8,31	8,31
frocohspneg	9	369,26	69,45
frocohsp tot	9	377,57	71,26
frocohspLI	9	1,56	1,56
frowmhsppos	9	3,61	3,61
frowmhspneg	9	65,2	9,39
frowmhsp tot	9	68,81	11,16
frowmhspLI	9	2,92	2,92
orbcohsppos	14	32,29	21,97
orbcohspneg	14	450,4	182,23
orbcohsp tot	15	583,84	194,65
orbcohspLI	15	12,8	6,95
orbwmhsppos	14	13,7	7,45
orbwmhspneg	14	72,7	6,99
orbwmhsp tot	14	86,4	8,63
orbwmhspLI	14	12,52	6,52
occohsppos	12	5,69	3,88
occohspneg	12	347,4	61,21
occohsp tot	12	353,09	61,54
occohspLI	12	1,55	1,17
occwmhsppos	12	3,25	2,68
occwmhspneg	12	45,93	7,04
occwmhsp tot	12	49,18	6,73
occwmhspLI	12	6,37	4,63
parcohsppos	14	3,02	2,78
parcohspneg	14	290,11	30,15
parcohsp tot	14	293,12	29,77
parcohspLI	14	1,18	1,12
parwmhsppos	14	6,04	4,93

parwemhspneg	14	60,6	14,32
parwemhsptot	14	66,64	13,44
parwemhspLI	14	9,11	7,26
temcohsppos	10	3,58	2,67
tempcohspneg	10	294,94	25,55
tempcohsptot	10	298,51	24,96
tempcohspLI	10	1,39	1,13
temwmhsppos	10	3,9	2,9
temwmhspneg	10	38,04	6,81
temwmhsptot	10	41,94	5,54
temwmhspLI	10	12,16	9,87
hipca1hsppos	11	31,34	31,34
hipca1hspneg	11	374,43	85,8
hipca1hsptot	11	405,77	77,44
hipca1hspLI	11	9,09	9,09
hipca4hsppos	11	63,85	32,48
hipca4hspneg	11	319,56	127,26
hipca4hsptot	11	383,41	117,04
hipca4hspLI	11	24,09	12,37
hipgrhsppos	11	559,9	388,56
hipgrhspneg	11	1730,85	344,1
hipgrhsptot	11	2290,75	274,88
hipgrhspLI	11	18,18	12,2
thalhsppos	14	43,43	15,53
thalhspneg	14	55,85	12,11
thalhstot	14	99,28	8,35
thalhspLI	14	35,46	12,2
caudhsppos	11	12,41	10,85
caudhspneg	11	250,09	27,78
caudhsptot	13	529,81	182,59
caudhspLI	13	10,83	5,56
puthsppos	11	1,48	1,01
puthspneg	11	240,04	55,08
puthsptot	11	241,52	55,08
puthspLI	11	2,58	2,47
pallhsppos	4	0	0
pallhspneg	4	295,91	71,7
pallhsptot	4	295,91	71,7
pallhspLI	4	0	0
cainthsppos	11	1,48	1,48
cainthspneg	11	220,96	40,29
cainthsptot	11	222,44	39,54
cainthspLI	11	5,36	5,36

khcohsppos	13	82,55	36,22
khcohspneg	13	223,62	41,69
khcohsptot	13	306,17	16,66
khcohspLI	13	28,21	12,3
khwmhsppos	0	.	.
khwmhsppneg	0	.	.
khwmhsptot	0	.	.
khwmhspli	0	.	.
khdenhsppos	9	115,98	23,61
khdenhsppneg	9	35,41	17,41
khdenhsptot	9	151,38	8,47
khdenhspli	9	72,45	14,16
meshsppos	11	70,65	23,42
meshsppneg	11	90,76	47,39
meshsptot	11	161,41	39,67
meshspLI	11	51,11	14,66
ponhsppos	0	.	.
ponhsppneg	0	.	.
ponhsptot	0	.	.
ponhspli	0	.	.
ponsnuchsppos	8	149,23	30,4
ponsnuchspneg	8	36,17	14,19
ponsnuchsptot	8	185,4	23,34
ponsnuchspLI	8	76,58	10,49
medhsppos	0	.	.
medhsppneg	0	.	.
medhsptot	0	.	.
medhspli	0	.	.
olvhsppos	8	296,32	56,91
olvhsppneg	8	113	64,03
olvhsptot	8	409,31	29
olvhspli	8	75,21	13,31
nig	0	.	.

	SIDS			
	1	Mean	SEM	p
HEIGHT	44	64,66	1,19	0,36
WEIGHT	44	6,17	0,28	0,43
BRWEIGHT	44	961,5	212,55	0,23
PMINH	44	31,41	3,73	0,56
BWEIGHT	44	5305,59	495,17	0
BHEIGHT	44	67,98	3,6	0
frocohsppos	20	51,7	26,94	0,26
frocohspneg	20	265,18	27,62	0,22
frocohsp tot	19	313,02	26,74	0,45
frocohspLI	19	10,79	6,23	0,35
frowmhsppos	20	14,25	6,77	0,21
frowmhspneg	20	75,85	8,69	0,41
frowmhsp tot	20	90,1	6,65	0,14
frowmhspLI	20	15,08	7,21	0,21
orbcohsppos	19	42,68	25,5	0,31
orbcohspneg	19	293,69	43,34	0,87
orbcohsp tot	19	336,37	44,96	0,65
orbcohspLI	19	9	4,98	0,61
orbwmhsppos	19	12,49	7,33	0,98
orbwmhspneg	19	101,99	11,66	0,16
orbwmhsp tot	19	114,48	11,27	0,07
orbwmhspLI	19	9,34	4,5	0,96
occohsppos	21	18,89	10,13	0,9
occohspneg	21	332,46	29,49	0,99
occohsp tot	21	351,35	30,84	0,9
occohspLI	21	5,05	2,68	0,88
occwmhsppos	21	6,31	3,06	0,65
occwmhspneg	21	59,26	6,99	0,14
occwmhsp tot	21	65,57	6,87	0,06
occwmhspLI	21	9,36	4,84	0,83
parcohsppos	21	52,96	24,38	0,26
parcohspneg	21	223,57	35,15	0,11
parcohsp tot	21	276,53	28,66	0,53
parcohspLI	21	17,41	7,99	0,25
parwmhsppos	21	8,05	3,15	0,26
parwemhspneg	21	54,5	8,02	0,75
parwemhsp tot	21	62,55	7,85	0,65
parwemhspLI	21	14,81	6,32	0,26
temcohsppos	17	56,87	25,33	0,29

tempcohspneg	17	337,23	36,88	0,45
tempcohstot	17	394,1	31,44	0,07
tempcohspLI	17	14,22	6,2	0,29
temwmhsppos	17	12,24	5,24	0,55
temwmhspneg	17	40,55	7,48	0,76
temwmhsptot	17	52,79	5,49	0,14
temwmhspLI	17	25,07	9,47	0,63
hipca1hsppos	16	199,99	52,2	0,01
hipca1hspneg	16	207,71	55,7	0,15
hipca1hsptot	16	407,69	25,69	0,35
hipca1hspLI	16	49,11	12,54	0,02
hipca4hsppos	16	142,67	44,01	0,23
hipca4hspneg	16	174,17	37,59	0,47
hipca4hsptot	16	316,84	22,49	0,29
hipca4hspLI	16	40,24	11,55	0,36
hipgrhsppos	15	865,04	354,41	0,44
hipgrhspneg	15	1347,12	275,77	0,36
hipgrhsptot	15	2212,15	187,56	0,78
hipgrhspLI	15	33,33	12,6	0,4
thalhsppos	19	70,82	12,6	0,26
thalhspneg	19	45,84	16,23	0,5
thalhstot	19	116,66	10,63	0,4
thalhspLI	19	63,7	10,34	0,23
caudhsppos	16	91,66	41,48	0,17
caudhspneg	16	203,64	42,15	0,47
caudhsptot	16	295,3	38,7	0,91
caudhspLI	16	28,73	10,58	0,31
puthsppos	16	80,68	37,77	0,04
puthsppneg	16	217,87	40,59	0,62
puthsptot	16	298,55	34,42	0,34
puthspLI	16	25,28	10,27	0,04
pallhsppos	11	56,05	26,63	0,03
pallhspneg	11	170,57	52,83	0,24
pallhsptot	11	226,62	45,74	0,36
pallhspLI	11	42,85	14,24	0,03
cainthsppos	16	78,24	36,48	0,01
cainthspneg	16	205,27	34,2	0,69
cainthsptot	16	283,51	34,53	0,25
cainthspLI	16	21,71	8,11	0,02
khcohsppos	17	172,73	40,82	0,04
khcohspneg	17	136,38	36,72	0,08
khcohstot	17	309,11	13,59	0,77
khcohspLI	17	53,1	12,27	0,06
khwmhsppos	0	.	.	

khwmhspneg	0	.	.	
khwmhsptot	0	.	.	
khwmhspLI	0	.	.	
khdenthsppos	14	127,05	21,84	0,7
khdenthsppneg	14	41,57	16,12	0,92
khdenthsptot	14	168,62	10,99	0,24
khdenthsplI	14	72,34	11,04	1
meshsppos	19	96,01	18,45	0,5
meshspneg	19	64,86	18,29	0,65
meshsptot	19	160,87	14,97	0,3
meshsplI	19	59,98	8,58	0,95
ponshsppos	0	.	.	
ponshspneg	0	.	.	
ponshsptot	0	.	.	
ponshsplI	0	.	.	
ponsnuchsppos	20	143,56	16,96	0,68
ponsnuchspneg	20	53,98	18,68	0,65
ponsnuchsptot	19	191,33	15,56	0,92
ponsnuchsplI	19	74,07	6,29	0,56
medhsppos	0	.	.	
medhsppneg	0	.	.	
medhsptot	0	.	.	
medhsplI	0	.	.	
olvhsppos	18	278,57	46,18	0,96
olvhsppneg	18	156,81	44,63	0,87
olvhsptot	18	435,38	14,73	0,33
olvhsplI	18	63,96	10,24	0,96
nig	0	.	.	

Tabelle 2. Vergleich von Körpergröße, Gewicht, Hirngewicht und postmortaler Liegezeit

NB: nicht bekannt

Alter/Geschlecht	Länge/Gewicht	Hirngewicht	PM-Zeit
31.SSW	43 cm / 1,5 kg	205 g	NB
Neugeb/W	49 cm / 2,7 g	335 g	33 Std
Neugeb/W	53 cm / 3,3 kg	407 g	6 Std
Neugeb/W	50 cm / 3,3 kg	NB	10 Std
1 Mon/W	53 cm / 3,5 kg	NB	30 Std
1 Mon/M	56 cm / 4,1 kg	487 g	7 Std
1 Mon/M	54 cm / 3,6 kg	NB	80 Std
1 Mon/W	54 cm / 3,3 kg	438 g	22 Std
1 Mon/W	54 cm / 4,9 kg	464 g	29 Std
1 Mon/W	58 cm / 4,6 kg	545 g	8 Std
1 Mon/W	52 cm / 3,8 kg	514 g	23 Std
2 Mon/W	56 cm / 4,4 kg	509 g	7 Std
3 ¼ Mon/M	60 cm / 4,4 kg	643 g	24 Std
2 ¾ Mon/W	58 cm / 5,1 kg	622 g	6 Std
3 Mon/M	58 cm / 3,9 kg	530 g	24 Std
3 Mon/W	56 cm / 4,5 kg	532 g	53 Std
3 Mon/W	57 cm / 4,3 kg	499 g	26 Std
3 Mon/W	71 cm / 8,5 kg	852 g	69 Std
3 Mon/M	62 cm / 6,3 kg	717 g	45 Std
3 Mon/M	63 cm / 6,3 kg	763 g	6 Std
3 Mon/W	60 cm / 5,3 kg	632 g	23 Std
3 Mon/W	57 cm / 3,9 kg	509 g	74 Std
5 Mon/W	65 cm / 6,7 kg	NB	10 Std
5 Mon/M	71 cm / 8,5 kg	774 g	42 Std
5 Mon/M	62 cm / 5,9 kg	692 g	30 Std
5 Mon/M	69 cm / 7,0 kg	704 g	19 Std
7 Mon/M	73 cm / 8,2 kg	941g	23 Std
7 Mon/M	72 cm / 7,4 kg	1081 g	28 Std
7 Mon/W	68 cm / 6,9 kg	856 g	30 Std
8 Mon/M	71 cm / 8,7 kg	1178 g	5 Std
10 Mon/M	79 cm / 10,0 kg	1192g	78 Std
10 Mon/M	74 cm / 7,7 kg	1030 g	29 Std
10 Mon/M	75 cm / 8,6 kg	1055 g	29 Std
11 Mon/M	93 cm / 13,1 kg	1250g	45 Std
11 Mon/M	80 cm / 8,4 kg	1125 g	7 Std
11 Mon/W	77 cm / 8,9 kg	1022 g	27 Std

11 Mon/W	78 cm / 8,5 kg	963 g	28 Std
13 Mon/W	79 cm / 8,9 kg	NB	38 Std
13 Mon/W	77 cm / 9,2 kg	1163 g	13 Std
2 J/M	96 cm / 14,9 kg	1365 g	13,5 Std
5 J/W	113 cm / 14,5 kg	886 g	8 Std
6 J/W	118 cm / 19,5 kg	1314 g	70 Std

8. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger, ehemaliger Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität in München, sowie bei dem jetzigen Vorstand Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Matthias Graw für die Möglichkeit, die hier vorgelegte Arbeit durchführen zu können.

Ich bedanke mich insbesondere meinen Betreuer Prof. Dr. med. Randolph Penning und Prof. Dr. med. habil. Andreas Büttner für die fachliche und menschliche Unterstützung während der gesamten Zeit!

Mein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Serge Weis, Leiter des Bereichs Neuropathologie am Institut für klinische Pathologie und Neuropathologie der Landesnervenklinik Wagner-Jauregg, Linz, für die Durchführung der Statistiken.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Susanne Ring, labortechnische Assistentin am Institut für Rechtsmedizin in München, für das Erstellen der Paraffinschnitte und für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung in jeder Hinsicht.

Ich danke vor allen meiner Familie: meinem Bruder Emir, meinen Eltern und meiner Tante Sada für ihre Unterstützung. Sie ermöglichten und erleichterten meine Studienzeit und sie bereichern mein Leben durch Ihre bedingungslose Liebe und ihr Dasein.



Eidesstattliche Versicherung

Sokocevic, Emina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Immunhistochemische Untersuchungen von HSP70 an Gehirnen von SIDS-Fällen"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Frankfurt am Main, 28.02.2020

Ort, Datum

Sokocevic Emina

Unterschrift Doktorandin/Doktorand